سیستم مدیریت ایزو

www.isomanagement.ir

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه **سیستم مدیریت ایزو** با هدف بهبود مستمرعملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی برآن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگارکنید...

ISO

9001
14001
18001

CE

GMP
GAP
22716

IMS
HSE-MS

22000
HACCP

45001

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

INSO
11611-16
1st Edition
2019

استاندارد ملی ایران
۱۶-۱۱۶۱۱
چاپ اول
۱۳۹۷

Identical with
ISO 5667-16: 2017

کیفیت آب- نمونه‌برداری-
قسمت ۱۶: آزمون زیستی نمونه‌ها- راهنما

Water quality- Sampling-
Part 16: Biotesting of samples- Guidance

ICS: 13.060.45

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۶-۱۱۶۱۱ (چاپ اول): سال ۱۳۹۷

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب‌غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج- ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴(۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وب‌گاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

Website:http://www.isiri.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به‌موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به‌عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و باتوجه‌به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به‌عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به‌عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به‌تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروفنون (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به‌عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات محیط‌زیستی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به‌منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. هم‌چنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سامانه‌های مدیریت کیفیت و مدیریت محیط‌زیستی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقاء سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«کیفیت آب- نمونه‌برداری- قسمت ۱۶: آزمون زیستی نمونه‌ها- راهنما»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
شریعتی، فاطمه (دکتری بیولوژی دریا)	عضو هیأت علمی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان
دبیر:	
آبادیان، محمدرضا (کارشناسی شیمی)	مدیرعامل- شرکت پویندگان بهبود کیفیت
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
ابراهیمی، سیده مریم (کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی)	مسئول کنترل کیفیت- شرکت کامپوره خزر
باقرزاده، آسان (دکتری محیط‌زیست و توسعه پایدار)	مدیر محیط‌زیست و کیفیت منابع آب- شرکت آب منطقه‌ای استان گیلان
زبده فلاحتی، نسیم (کارشناسی ارشد شیمی)	مدیر کنترل کیفیت- واحد تولیدی لویه
زلفی‌نژاد، کامران (کارشناسی ارشد مهندسی شیلات)	مشاور رئیس پژوهشکده- مرکز ملی تحقیقات آبزیان استان گیلان
صادقی‌پور شیجانی، معصومه (کارشناسی ارشد علوم محیط زیست)	رئیس اداره هماهنگی و تدوین استاندارد- اداره کل استاندارد گیلان
فرحناک شهرستانی، لحیا (کارشناسی ارشد شیمی آلی)	کارشناس- انجمن کارشناسان استاندارد استان گیلان
فرهنگی، محمدباقر (دکتری بیولوژی خاک)	عضو هیأت علمی- دانشگاه گیلان
قماش‌پسند، مریم (دکتری شیمی معدنی)	مدرس- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/یا محل اشتغال:**
کاسبی، شیلا (کارشناسی علوم تغذیه)	مدیر کنترل کیفیت– شرکت چم چمال گوشت
مقبلی‌کهن‌زاد، فاطمه (کارشناسی مهندسی فن آوری اطلاعات)	کارشناس پیگیری امور تدوین- اداره کل استاندارد استان گیلان
موقرحسنی، فرحناز (کارشناسی مهندسی مکانیک)	کارشناس- شرکت آب و فاضلاب شهری استان گیلان
میرروشندل، اعظم السادات (دکتری شیمی تجزیه)	رئیس اداره امور آزمایشگاه‌ها- اداره کل حفاظت محیط زیست استان گیلان

ویراستار:

آغه‌میری، اسرین (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	رئیس اداره هماهنگی امور تدوین استاندارد- اداره کل استاندارد کردستان

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	ح
مقدمه	ط
۱ هدف و دامنهٔ کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۱
۴ راهنمای کلی طراحی آزمون	۸
۴-۱ کلیات	۸
۴-۲ تکرارها	۹
۵ سنجش	۱۱
۵-۱ کلیات	۱۱
۵-۲ تجزیه و تحلیل آماری	۱۲
۶ نمونه‌برداری و حمل و نقل	۱۲
۶-۱ کلیات	۱۲
۶-۲ تجهیزات نمونه‌برداری	۱۳
۶-۳ چگونگی پرکردن ظروف نمونه	۱۵
۶-۴ شناسایی و یادداشت مشخصات نمونه	۱۵
۶-۵ زیرنمونه‌برداری	۱۵
۶-۶ حمل و نقل	۱۶
۶-۷ آلودگی طی نمونه‌برداری	۱۶
۶-۸ فنون کنترل کیفیت نمونه‌برداری	۱۷
۷ آماده‌سازی	۱۷
۷-۱ کلیات	۱۷
۷-۲ محافظت و ذخیره‌سازی	۱۸
۷-۳ یخ‌زدایی	۱۹
۷-۴ همگن‌سازی	۱۹
۷-۵ جداسازی محلول و ذرات معلق	۲۰
۷-۶ پیش‌تغلیظ	۲۱
۷-۶-۱ کلیات	۲۱
۷-۶-۲ روش‌های استخراج	۲۲

عنوان **صفحه**

۷-۷ تنظیم PH ۲۲
۸ دستگاه‌ها و تجهیزات ۲۳
۸-۱ انتخاب دستگاه‌ها ۲۳
۸-۲ تمیز کردن دستگاه‌ها و تجهیزات ۲۳
۹ اختلال در عملکرد آزمون ۲۳
۹-۱ مشکلات و اقدامات پیش‌گیرانه برای نمونه‌های حاوی مواد قابل حذف ۲۳
۹-۱-۱ کلیات ۲۳
۹-۱-۲ تبخیر ۲۴
۹-۱-۳ کف کردن ۲۵
۹-۱-۴ جذب سطحی ۲۵
۹-۱-۵ ته‌نشینی/لخته‌سازی ۲۵
۹-۱-۶ تجزیه ۲۵
۹-۲ مشکلات و اقدامات پیش‌گیرانه در نمونه‌های رنگی و/یا کدر ۲۶
۱۰ آماده‌سازی محلول‌های مادر و بهرهای آزمون ۲۶
۱۰-۱ مواد محلول در آب ۲۶
۱۰-۲ مواد کم محلول ۲۶
۱۰-۲-۱ کلیات ۲۶
۱۰-۲-۲ آزمون در محدودهٔ حلالیت در آب ۲۷
۱۰-۲-۳ پراکندگی‌ها و امولسیون‌ها ۲۸
۱۰-۲-۴ مشکلات ویژهٔ مخلوط‌های مواد یا محصولات فنی ۲۸
۱۰-۲-۵ آزمون حد ۲۹
۱۱ تضمین کیفیت آزمون زیستی ۲۹
۱۱-۱ کلیات ۲۹
۱۱-۲ تضمین کیفیت در چارچوب بررسی نمونه‌های محیطی ۳۰
۱۲ گزارش ۳۱
کتاب‌نامه ۳۵

پیش‌گفتار

استاندارد «کیفیت آب- نمونه‌برداری- قسمت ۱۶: آزمون زیستی نمونه‌ها- راهنما» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی به‌عنوان استاندارد ملی ایران به‌روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین شده، در بیست و چهارمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد آب و آبفا مورخ ۹۷/۱۲/۱ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم وخدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به‌روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO 5667- 16: 2017, Water quality- Sampling-- Part 16: Guidance on biotesting of samples

مقدمه

آزمون‌های بیولوژیکی (زیست‌شناختی) برای تعیین اثر نمونه‌های محیطی یا مواد شیمیایی روی موجودات زندهٔ آزمون مربوطه در شرایط آزمون استاندارد خاص مناسب هستند. نمونه‌های محیطی به‌عنوان مثال فاضلاب جوامع انسانی و صنعتی تصفیه شده، آب شیرین، عصاره‌های آبی حاصل از مواد جامد (مانند شیرابه‌ها، مواد آب‌شویی شده)، آب منفذی رسوبات می‌باشد. این اثر می‌تواند محرک یا بازدارنده باشد و می‌تواند از طریق واکنش موجود زندهٔ آزمون (مانند مرگ، رشد، تغییرات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی یا به‌طورکلی تغییرات در سازوکارهای مولکولی عمل) مشخص شود. اثرات بازدارنده می‌تواند از طریق عناصر سمی در آب یا سایر تاثیرات مخرب ایجاد شود.

سمیت قابل اندازه‌گیری در آزمون بیولوژیکی نتیجهٔ برهم‌کنش بین یک مادهٔ سمی مجزا، مخلوطی از مواد یا اجزای یک نمونهٔ محیطی و موجود زندهٔ آزمون است. پتانسیل حفاظتی سیستم بیولوژیکی، یعنی موجود زندهٔ آزمون، به‌عنوان مثال از طریق دفع و سمیت‌زدایی متابولیکی، بخشی جدایی‌ناپذیر از آزمون بیولوژیکی است. غیراز اثر مستقیم سمیت یک یا چند جزء نمونه، تاثیرات بیولوژیکی می‌تواند از طریق عمل ترکیبی تمام اجزای یک نمونه اعمال شود. چنین اثر ترکیبی شامل، به‌عنوان مثال، اثر مواد شیمیایی است که به‌تنهایی سمی نیستند، بلکه با تداخل در افزودنی‌های خاص آزمون (مانند مواد مغذی، نمک‌ها) و درنتیجه شرایط زندگی برای موجودات زندهٔ آزمون، ویژگی‌های شیمیایی یا فیزیکی بهرهای آزمون را تحت‌تاثیر قرار می‌دهند. که به‌عنوان مثال در مورد مواد تخلیه‌کنندهٔ اکسیژن، مواد رنگی یا مواد کدر به‌کار می‌رود که مواجهه با نور را کاهش می‌دهد.

آزمون‌های بیولوژیکی نیز شامل آن دسته آزمون‌هایی است که اثر موجودات زندهٔ آزمون را روی مواد بررسی می‌کنند (برای مثال مطالعات تخریب میکروبی).

نتایج آزمون بیولوژیکی در درجهٔ اول به موجودزندهٔ مورداستفاده در آزمون و شرایط تصریح‌شده در روش اجرای آزمون اشاره دارد. یک اثر نامطلوب که به‌وسیله آزمون‌های بیولوژیکی استاندارد بیان‌شده، می‌تواند دربارهٔ امکان این‌که موجودات زندهٔ آبزی و هم‌زیگاه[1] در معرض خطر قرار گیرد را توجیه‌پذیرکند. بااین‌حال، این نتایج، امکان نتیجه‌گیری مستقیم یا تعمیم‌یافته مانند وقوع اثرات مشابه در محیط آبزی را فراهم نمی‌کند. این مسئله به‌خصوص برای آزمون‌های زیر موجودزنده به‌کار می‌رود، زیرا خواص مهم و عملکردهای فیزیولوژیکی موجودات زندهٔ سالم (مانند پوسته‌های محافظ، سازوکارهای ترمیمی) حذف یا غیرفعال می‌شوند.

در اصل هیچ موجود زنده‌ای برای آزمون وجود ندارد که از آن بتوان برای آزمون تمام اثرات روی هم‌زیگاه یا اکوسیستم (بوم‌سازگان) مناسب (دارای شرایط مورد قبول) در ترکیبات مختلف از شرایط زیستی و

1- Biocoenosis

اجتماعی از جانوران و گیاهانی که از نظر زیست‌شناسی همبسته و یگانه‌اند.

غیرزیستی استفاده کرد. فقط چند گونه (مدل) که عملکرد اکولوژیکی (بوم‌شناختی) مربوطه را نمایندگی می‌کنند، می‌توانند در عمل، آزمون شوند.

در کنار محدودیت‌های اساسی و عملی در انتخاب موجودات زندهٔ آزمون، به‌منظور جلوگیری از تغییر در خواص نمونه، بهتر است برخی از مسائل طی نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه مورد توجه قرار گیرد. این مسئله در مورد روش نمونه‌برداری، از جمله تجهیزات نمونه‌برداری و ظرف نمونه و انتقال به آزمایشگاه نیز صادق است. روش پیش‌آماده‌سازی و ذخیره‌سازی نمونه و هم‌چنین آماده‌سازی آن، برای مثال، محلول‌های مادر، می‌تواند بر نتیجهٔ آزمون تاثیر بگذارد.

علاوه‌براین، نمونهٔ مورد بررسی می‌تواند مشکلات آزمونی را در انجام آزمون زیستی ایجاد کند. نمونه‌های محیطی (به‌عنوان مثال، فاضلاب، محصول شویش) مخلوط‌های مرکبی هستند و ممکن است به‌عنوان مثال، حاوی مقدار کمی مواد محلول، فرار، ناپایدار، رنگی یا ذرات معلق، گاهی کلوئیدی باشد. پیچیدگی و ناهمگنی مواد باعث ایجاد مشکلات مختلفی هنگام اجرای آزمون زیستی می‌شود.

مشکلات خاص مربوط به بی‌ثباتی مواد آزمون به‌علت واکنش‌ها و فرایندها به‌شرح زیر است:

- فیزیکی (برای مثال جدایی فاز، رسوب‌گذاری، تبخیر)؛

- شیمیایی (به‌عنوان مثال، هیدرولیز، تخریب نوری، ته‌نشینی)؛

- بیولوژیکی (به‌عنوان مثال تجزیهٔ زیستی، دگرگونی زیستی، جذب بیولوژیکی در موجودات زندهٔ آزمون).

سایر مشکلات، به‌خصوص در صورت اندازه‌گیری‌های طیف‌سنجی، مربوط به کدورت و رنگ بهر آزمون است.

بهتر است، تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمون زیستی نمونه‌های محیطی مطابق با وضعیت فعلی انجام شود، در غیراین‌صورت طبق تصریح استاندارد آزمون زیستی انجام گیرد.

در نهایت، علی‌رغم اجرای آزمون، مواد یا نمونه‌های محیطی در یک آزمایشگاه، توصیه می‌شود یک سامانهٔ مدیریت کیفیت برقرار و اجرا شود.

این استاندارد یک قسمت از مجموعه استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۱۱۶۱۱ است.

کیفیت آب- نمونه‌برداری- قسمت ۱۶: آزمون زیستی نمونه‌ها- راهنما

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، ارائهٔ راهنمای عملی در زمینهٔ نمونه‌برداری، آماده‌سازی، عملکرد و سنجش نمونه‌های محیطی برای انجام آزمون‌های زیستی است. اطلاعاتی هم در مورد چگونگی مقابله با مشکلات آزمون زیستی ناشی از نمونه و مناسب بودن طرح آزمون، ارائه شده است.

هم‌چنین انتقال تجربیات عملی درخصوص اقدامات احتیاطی که باید در حل یا رفع برخی از مشکلات تجربی آزمون زیستی مانند آزمون زیستی آب‌ها در نظر گرفته شوند. این اقدامات همراه با تشریح روش‌هایی که ثابت شده در این زمینه موفق بوده‌اند، ارائه می‌شود.

در درجهٔ اول، مشکلات مادهٔ مربوط در زمینهٔ نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌های محیطی (به‌عنوان مثال نمونه‌های فاضلاب) برای انجام آزمون‌های زیستی مورد توجه قرار گرفته است.

این استاندارد برای آزمون سم‌شناسی محیطی روی موجودات زندهٔ آزمایشگاهی (آزمون‌های زیستی تک گونه‌ای، با موجودات زنده (درون‌تنی)[1] و در آزمایشگاه (برون‌تنی)[2]) کاربرد دارد. برخی از ویژگی‌های بیان شده در این استاندارد برای آزمون‌های زیستی با استفاده از سیستم‌های تک سلولی (زیست‌سنجی در محیط کشت) و مطالعات تجزیهٔ زیستی، تا جایی‌که به نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه مربوط باشد، کاربرد دارد.

این استاندارد برای آزمون‌های زیستی به‌منظور تعیین اثر نمونه‌های محیطی مانند فاضلاب‌های عمومی و صنعتی تصفیه‌شده، آب‌های زیرزمینی، آب‌های شیرین، عصاره‌های آبی (مانند شیرابه‌ها، مواد آب‌شویی شده)، آب منفذی رسوبات و کل رسوب و مواد شیمیایی؛ آزمون مواد در محدودهٔ حلالیت آب، کاربرد دارد.

این استاندارد برای بررسی باکتری‌شناسی آب کاربرد ندارد، روش‌های مناسب آزمون باکتری‌شناسی در سایر اسناد ذکر شده است [19].

۲ مراجع الزامی

این استاندارد مراجع الزامی ندارد.

۳ اصطلاحات و تعاریف

1- In vivo
2- In vitro

در این استاندارد، اصطلاحات با تعاریف زیر به‌کارمی‌رود[۱]:

۳-۱

شاهد

blank

مخلوطی از آب و مواد مغذی بدون موجود زندهٔ آزمایشی را گویند.

۳-۲

غلظت سلولی

cell density (*x*)

تعداد سلول‌ها در واحد حجم محیط کشت است.

یادآوری- غلظت سلول‌ها برحسب سلول در هر میلی‌لیتر بیان می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند 3.1 استاندارد ISO 10253:2016] [15]

۳-۳

کنترل

control

محیط کشت کنترل (مطابق زیربند ۳ -۴)، یا *رسوب کنترل* (مطابق زیربند ۳-۵)، شامل موجودات زندهٔ مورد استفاده در این آزمون، بدون نمونهٔ آزمون است.

۳-۴

محیط کشت کنترل

control medium

ترکیبی از آب رقیق‌سازی و محیط مغذی مورد استفاده در این آزمون است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۶ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳] [۱۲]

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کار رفته در استانداردهای ISO و IEC در وب‌گاه‌های http://www.iso.org/obp و http://www.electropedia.org/ قابل دسترس است.

۳-۵

رسوب کنترل

control sediment

رسوب مصنوعی یا طبیعی تعریف‌شدهٔ مورد استفاده در آزمون را گویند.

۳-۶

سطح رقیق‌سازی

D

dilution level

معکوسِ نسبت حجمی نمونهٔ آزمون در *آب رقیق‌سازی* (مطابق زیربند ۳-۷) که در آن آزمون انجام می‌شود.

مثال:

۲۵۰ ml فاضلاب در حجم کل ۱۰۰۰ ml (نسبت حجمی ٪ ۲۵) نشان‌دهندهٔ سطح رقت D = ۴ است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۲ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۰۷۸، تغییرات: کلمهٔ «نمونهٔ آزمون» جایگزین کلمهٔ «فاضلاب» شده است.] [۸]

۳-۷

آب رقیق‌سازی

dilution water

آب اضافه‌شده به نمونهٔ آزمون برای تهیهٔ مجموعه‌ای از رقت‌های معین را گویند.

یادآوری- ترکیب آب در استاندارد مربوطه مشخص می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳، تغییرات: یادآوری اضافه شده است.] [۱۲]

۳-۸

غلظت موثر

effective concentration (EC_x)

غلظت مواد آزمون در آب یا رسوب که طی یک فاصلهٔ زمانی مشخص، موجب تغییر ٪ x در پاسخ می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند 3.8.1 استاندارد ISO/TS 20281:2006، تغییرات: واژهٔ کمیت از اصطلاحات و کوته‌نوشت‌ها حذف شده است، کلمهٔ خاک و (برای مثال بی‌حرکتی) از تعاریف حذف شده است، مثال و یادآوری‌های ۱ و۲ گنجانده نشده است.] [20]

۳-۹

شاهد میدانی

field blank

ظرفی که با استفاده از آب واکنش‌گر یا سایر مواد زمینهٔ شاهد در آزمایشگاه آماده می‌شود (شسته می‌شود) و به‌همراه نمونه‌برداران به محل نمونه‌برداری برده می‌شود تا در معرض محیط قرار گرفته و بتوان با آن آلودگی احتمالی طی نمونه‌برداری را بررسی کرد.

[منبع: برگرفته از زیربند 3.5.4 استاندارد ISO 11074:2015] [17]

۳-۱۰

نرخ رشد

growth rate

نرخ نسبی افزایش زیست‌توده در واحد زمان $\frac{۱}{\text{روز}}$ است.

[منبع: برگرفته از زیربند 3.2 استاندارد ISO 10253:2016، تغییرات: کلمهٔ «نرخ رشد » جایگزین کلمهٔ «نرخ رشد ویژه» شده است. فرمول‌ها و یادآوری ۱ گنجانده نشده است][17]

۳-۱۱

کمترین رقیق‌سازی بدون اثر

فاکتور رقیق‌سازی

lowest ineffective dilution (LID)

dilution factor

کمترین رقت بدون اثر آزمون شده که به‌عنوان *سطح رقیق‌سازی D* (مطابق زیربند ۳-۶) بیان می‌شود و در آن هیچ بازدارندگی وجود ندارد یا فقط اثراتی که کمتر از تغییرات ویژهٔ آزمون باشد، مشاهده می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۵ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۸۰۷۸] [۸]

۳-۱۲

محیط مغذی

nutrient medium

محلولی از مواد مغذی و ریزمغذی‌های موجود در آب که برای رشد موجودات زندهٔ آزمایشگاهی ضروری است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۱۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳، تغییرات: کلمهٔ «موجود زندهٔ آزمایشگاهی» جایگزین کلمهٔ «خزه» شده است.][17]

۳-۱۳

کنترل مثبت

positive control

مادهٔ مرجع شناخته شده (مطابق زیربند ۳-۱۴) که وقتی با روش آزمون خاص بررسی می‌شود، قابلیت تناسب سیستم آزمون برای رسیدن به یک پاسخ تکرارپذیر، مثبت یا واکنش‌پذیر را نشان دهد.

[منبع: برگرفته از زیربند 3.14 استاندارد ISO 10993-12:2010, تغییرات: کلمهٔ «هیچ» قبل از «شناخته شده» حذف شده است، «مادهٔ مرجعی که» جایگزین «مواد و/یا ماده که» شده است.] [۵]

۳-۱۴

مادهٔ مرجع

reference substance

مادهٔ شناخته‌شده به‌منظور بررسی حساسیت روش است.

۳-۱۵

دستهٔ مرجع

reference batch

مخلوطی از آب رقیق‌سازی، مواد افزودنی ویژهٔ آزمون و مادهٔ مرجع که شامل موجودات زندهٔ آزمایشی است.

۳-۱۶

تکرار

replicate

یکی از شماره‌های انتخاب‌شدهٔ *بهرهای آزمون* مشابه (مطابق زیربند ۳-۲۴) یا *بهرهای مرجع* یکسان (مطابق زیربند ۳-۱۵) را گویند.

۳-۱۷

نمونه

sample

بخشی از ماده که از مقدار بزرگ آن انتخاب می‌شود.

یادآوری۱- روش انتخاب نمونه را می‌توان در برنامهٔ نمونه‌برداری توصیف کرد.

یادآوری۲- منظور از ماده، مادهٔ محیطی (برای مثال فاضلاب، رسوب یا مواد آب‌شویی شده)، مادهٔ شیمیایی یا آماده‌سازی و مواد مربوط به آن است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۲-۱۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴۵۳۰، تغییرات: یادآوری‌های ۱ و ۲ اضافه شده است.] [۱۰]

۳-۱۸

آماده‌سازی نمونه

sample pre-treatment

به مجموع تمام فرایندهایی که برای آماده‌سازی نمونه و رساندن آن به‌حالت معین که امکان بررسی‌های بعدی را فراهم می‌کند، گفته می‌شود.

یادآوری- با توجه به الزامات این روش، آماده‌سازی شامل محافظت و انبارکردن، سانتریفیوژ، پالایه‌کردن، همگن‌سازی، پیش تغلیظ و تنظیم pH است.

۳-۱۹

انبارش نمونه

sample storage

پردازش و نگه‌داری نمونهٔ موجود در شرایط از پیش تعیین‌شده و در یک بازهٔ زمانی مشخص(به‌طورمعمول) بین جمع‌آوری و آماده‌سازی بیشتر آن است.

یادآوری- زمان مشخص، حداکثر فاصلهٔ زمانی است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۳ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۱۱۶۱۱] [۱]

۳-۲۰

محیط کشت مادر

stock culture

محیط کشت یک نوع گونه برای حفظ گونه‌های تعریف شدهٔ اصلی در آزمایشگاه است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۲۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳، تغییرات: کلمهٔ «خزه»، «عدسک آبی» «و تهیهٔ مایهٔ تلقیح برای کشت اولیه» حذف شده است.][۱۲]

۳-۲۱

محلول مادر

stock solution

محلولی با غلظت(های) دقیق آنالیت، که از مواد شیمیایی با خلوص مناسب تهیه شده است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۲۳ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۰۸۴۸] [۶]

۲۲-۳

زمان انبارش

storage time

مدت زمان بین پرکردن ظرف نمونه و آماده‌سازی بیشتر آن در آزمایشگاه، در صورت نگـه‌داری در شـرایط از پیش تعیین‌شده است.

یادآوری- به محض پرشدن ظرف نمونه از آن، نمونه‌بـرداری تمـام مـی‌شـود. بـا تحویـل نمونـه بـه آنالیزکننـده بـرای شـروع آماده‌سازی نمونه قبل از آنالیز هم زمان انبارش به‌پایان می‌رسد.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۴ استاندارد ملی ایران شـمارهٔ ۳-۱۱۶۱۱، تغییـرات: یـادآوری گنجانـده نشـده است.][۱]

۲۳-۳

زیرنمونه

sub-sample

بخش نمایان‌گر برداشته‌شده از یک نمونه است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۷ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۹۰۹] [۴]

۲۴-۳

بهرهای آزمون

test batch

محیط آزمون شامل موجودات زندهٔ مورد استفاده برای آزمون است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۲۲ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳] [۱۲]

۲۵-۳

محیط کشت آزمون

test medium

مخلوطی از نمونه یا مادهٔ آزمون، آب رقیق‌سازی و مواد مغذی (بدون موجودات زندهٔ آزمون) است.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۲۳ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳، تغییرات: کلمـهٔ «مخلـوط»، جـایگزین کلمهٔ «ترکیب»، بعد از نمونهٔ آزمون «یا مواد آزمون» اضافه شده است، «/یا» حذف شده است، عبارت «مـواد مغذی (بدون موجودات زندهٔ آزمون)» جایگزین «محیط مغذی مورد استفاده در آزمون» شده است.] [۱۲]

۳-۲۶

نمونهٔ آزمون

test sample

نمونه‌ای که پس از اتمام کلیهٔ مراحل آماده‌سازی، آزمون می‌شود.

مثال: آماده‌سازی شامل سانتریفیوژ، پالایه‌کردن، همگن‌سازی، تنظیم pH و اندازه‌گیری هدایت الکتریکی می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند 3.7 استاندارد ISO 13829:2000][18]

۳-۲۷

مادهٔ اصلی آزمون

test substance

مادهٔ شیمیایی مورد بررسی که به سیستم آزمون اضافه می‌شود.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۱۰ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۳۲۳] [۹]

۳-۲۸

مادهٔ آزمون

test material

موادی که باید بررسی یا آزمون شوند.

[منبع: برگرفته از زیربند ۳-۳ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۰۵، تغییرات: مثال حذف شده است.] [۱۱]

۴ راهنمای کلی طراحی آزمون

۴-۱ کلیات

توصیه می‌شود در هر آزمون، گروه‌های کنترل و تیمار در چند تکرار آزمایش شوند. حداقل تعداد تکرارها به‌طورمعمول در استاندارد مربوطه تعیین می‌شود. یک مثال از چگونگی محاسبهٔ تعداد مشاهدات (تکرارها) موردنیاز در زیربند ۴-۲-۳ آورده شده است.

توصیه می‌شود که پیامدهای تفاوت در شرایط آزمون (برای مثال نور، دما) به‌حداقل برسد. برای مثال، با تصادفی کردن چیدمان ظروف آزمون در محفظهٔ آزمون، این کار انجام‌پذیر است.

برای اطمینان از این‌که شرایط آزمون آزمایشگاهی (از جمله وضعیت و حساسیت موجودات زندهٔ آزمون) مناسب باشد و تغییر چشم‌گیر نداشته باشد، بهتر است یک مادهٔ مرجع به‌عنوان کنترل مثبت در آزمون قرار گیرد.

۴-۲ تکرارها

۴-۲-۱ کلیات

به‌طور عمده سه رویکرد آماری در تحلیل آماری نتایج حاصل از آزمون‌های سم‌شناسی با نمونه‌های محیطی اجرا می‌شود.

الف- تعیین پایین‌ترین رقت بدون اثر (LID) در آزمون، برای مثال، فاضلاب؛

ب- مقایسهٔ دو نمونه‌ای بین کنترل (یا بهر مرجع) یا آزمون یا بهرهای کنترل مثبت (استاندارد سمی)؛

پ- محاسبهٔ برآوردهای نقطه‌ای [برای مثال EC_{20}، LC_{50} (غلظت مرگبار)] از مقادیر غلظت مدل‌سازی شده یا روابط پاسخ رقت.

به‌طورمعمول در آزمون سم‌شناسی نمونه‌های محیطی، تعیین NOEC[1] (غلظت بدون اثر) و LOEC[2] (کم‌ترین غلظت موثر) مدنظر نیست و بنابراین در این استاندارد بررسی نمی‌شود. اگر در شرایط استثنایی ارزیابی NOEC باید انجام شود، به استاندارد ISO/ TS 20281 [20] مراجعه شود.

تعداد تکرارهای بیشتر در آزمون فرضیه‌ها (برای مثال مقایسهٔ دو نمونه) مهم و ضروری است و وابسته به تغییرپذیری نقطهٔ پایانی مورد سنجش، حداقل اندازهٔ اثر که باید از طریق آزمون آماری تشخیص داده شود و توان آماری، است. برآورد EC_x تقاضاهای متفاوتی را در طراحی مطالعه نسبت به مقایسهٔ دو نمونه‌ای ارائه می‌کند (به استاندارد ISO/ TS 20281 [20] مراجعه شود).

۴-۲-۲ کمترین رقت بدون اثر (LID)

در آزمون سمیت فاضلاب یا مواد آب‌شویی شده، نمونه بر اساس طرح مشخصی از رقت‌ها (D)، رقیق می‌شود. کم‌ترین میزان رقت بدون اثر (LID) به غلیظ‌ترین دستهٔ آزمونی گفته می‌شود که در آن بازدارندگی وجود نداشته باشد، یا مرگ و میری رخ ندهد یا تنها اثراتی که از حد خاصی از آزمون تجاوز نمی‌کند، وجود داشته باشد (برای مثال استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳ [۱۲]: بازدارندگی ده درصدی نرخ رشد گونهٔ عدس آبی *لمنا*[3]). D به‌عنوان معکوسِ نسبت حجمی برای مثال فاضلاب در دستهٔ آزمون بیان می‌شود.

این رویکرد نیازی به آنالیز آماری بیشتر (برای مثال آزمون فرضیه) ندارد.

1- No Observed Effect Concentration
2- Lowest Observed Effect Concentration
3- *Lemna*

۴-۲-۳ آزمون فرضیه- مقایسهٔ دو نمونه‌ای

مقایسهٔ دو نمونه‌ای آماری در آزمون نمونه‌های محیطی نقش مهمی دارد. این کار به‌منظور مقایسهٔ نمونه‌های حاصل از محل‌های مختلف نمونه با یک محل مرجع (برای مثال نمونه‌های حاصل از یک منطقهٔ آلودهٔ آب‌های جاری با نمونهٔ حاصل از محل مرجع غیرآلوده در بالادست) یا مقایسهٔ نمونه‌های گرفته شده در دوره‌های مختلف، انجام می‌شود.

در برخی موارد، برای مثال وقتی که می‌خواهیم مشخص کنیم چگونه یک سطح رقت خاص، یک اثر را نشان می‌دهد، مقایسهٔ دو نمونه‌ای شامل مقایسهٔ پاسخ‌ها در یک کنترل و غلظت آزمون یا کنترل مثبت می‌تواند انجام شود (به زیربند ۱۰-۲-۵ مراجعه شود).

هنگام مقایسهٔ دو نمونه‌ای، نوع داده‌های نقطهٔ پایانی، یعنی کیفی (کوانتال)[1] یا کمی (متریک) بودن متغیرهای تحت بررسی اهمیت تعیین‌کننده‌ای در انتخاب روش آزمون و محاسبهٔ تعداد تکرارهای مورد نیاز دارد. علاوه‌براین، آزمون آماری مبتنی بر تحلیل واریانس (ANOVA)[2] نیاز به توزیع نرمال داده‌ها و همگن بودن واریانس آن‌ها دارد.

مرگ و میر (یا بی‌حرکتی) موجودات زندهٔ آزمایشگاهی که در آزمون حاد[3] تعیین می‌شود، یک متغیر کوانتال (کیفی) معمول است.

در مقابل، متغیرهای کمّی، مانند یک شیب پاسخ، افزایش پیوسته را نشان می‌دهند. برای مثال طول بدن یا زیست‌توده، سرعت سوخت و ساز، تولید اکسیژن، میزان مصرف یا میزان تبدیل آنزیمی از متغیرهای کمّی معمول هستند. ممکن است تعداد حیوانات تازه متولد شده نیز به‌عنوان یک متغیر متریک تقریبی درنظر گرفته شوند.

فرمول‌های محاسبهٔ تعداد مشاهدات (تکرارهای) موردنیاز در کتاب‌های آماری و مقالات [24] آمده است. به‌عنوان مثال، برای مقایسه یک متغیر کمّی (مانند زیست‌توده) اندازه‌گیری شده در نمونهٔ آب یا رسوبِ یک محل آلوده و یک محل مرجع، آزمون جفتی t تست انجام می‌شود. محاسبهٔ اندازهٔ موردنیاز نمونه در فرمول (۱) ارائه شده است [24]:

$$n \geq 2\left(\frac{\sigma}{\delta}\right)^2 \left(t_{\alpha,df} + t_{2\beta,df}\right)^2$$

که در آن:

n تعداد تکرارها؛

σ انحراف استاندارد واقعی نقطهٔ پایانی؛

1- Quantal
2- Analysis of variance
3- Acute Test

δ کم‌ترین اختلاف واقعی؛

df درجات آزادی هستند (که این‌جا: $df= n_1+n_2-2$)؛

α سطح معنی‌داری مورد نظر (برای مثال ۰/۰۵)؛

β خطای نوع II مورد نظر [$1-\beta$ «قدرت» آزمون آماری گفته می‌شود و نشان دهندهٔ احتمالی است که اختلاف پیدا شدهٔ معنی‌دار خواهد بود (حتی اگر آن اختلاف به‌کوچکی δ باشد)]؛

$t_\alpha/t_{2\beta}$ مقادیر حاصل از جدول t دو دنباله‌ای با درجات آزادی df هستند.

لازم است که فقط نسبت σ به δ را بدانیم نه مقادیر واقعی آن‌ها را (برای مثال با توجه به ضریب تغییر ٪۲۰ و اختلاف قابل تشخیص موردنظر ٪۱۰، این نسبت ۲ است). برای فرمول سایر روش‌های آزمون، به کتاب‌های آماری یا استاندارد ISO/TS 20281 [20] مراجعه شود.

۴-۲-۴ رابطهٔ پاسخ غلظت و رقت

از مدل‌سازی پاسخ غلظت و رقت می‌توان برای تعیین اندازه‌های اثر قطعی (به‌عنوان مثال EC_{10}، EC_{50}، LC_{50}) که به‌وسیلهٔ بخش‌های حجمی نمونهٔ آزمون مورد بررسی قرار می‌گیرد، استفاده کرد. بهتر است از این روش برای تجزیه و تحلیل اثرات مواد مرجع به‌منظور نشان دادن عملکرد سیستم آزمون (برای مثال استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۱۷۷۳ [12] استفاده شود).

دیده شده که این آزمون درصورتی معتبر است که EC_{50} به‌دست آمده برای مواد مرجع در محدودهٔ حد بالا و پایین EC_{50} که در سری آزمون‌های قبلی تعیین شده، مطابقت داشته باشد.

الزام اولیهٔ طرح، داشتن تعداد کافی گروه‌های غلظت (رقت) است. از آنجا که دقت برآورد شدهٔ EC_x بیشتر به اندازهٔ کل آزمایش بستگی دارد تا به تعداد نمونه در هر گروه غلظت یا رقت، این کار می‌تواند سبب کم شدن تکرارها در هر گروه شود (اما تعداد کل آزمایش همان باشد).

در این‌جا هم نوع داده‌های پایانی، یعنی این‌که آیا متغیرها کیفی (کوانتال) یا کمی (متریک) باشند، اهمیت تعیین کننده‌ای در طراحی آزمون و روش آماری دارد (به استاندارد ISO/TS 20281 [20] مراجعه شود).

۵ سنجش

۵-۱ کلیات

سنجش نتایج آزمون ابتدا شامل بررسی دقیق داده‌ها و ارائه و توصیف نتایج آزمون با استفاده از نمودارها، جداول و پارامترهای آماری مناسب مانند میانگین‌ها و اندازه‌گیری پراکندگی (آمار توصیفی) است.

در بسیاری از موارد، پردازش آماری پیشرفته‌تر نیز انجام می‌شود که هدف آن تعیین روابط پاسخ غلظت یا رقت برای محاسبهٔ پارامترهای آماری مناسب و به‌منظور کمّی کردن اثر و بررسی معنی‌داری آماری (برآورد و

آزمون آمار) است. این سنجش پیشرفته‌تر آماری فقط در صورتی مفید است که داده‌ها برای این‌منظور کافی باشند. این امر نیازمند بررسی دقیق داده‌ها است.

۵-۲ تجزیه و تحلیل آماری

بهتراست، تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمون‌های سمیت نمونه‌های محیطی مطابق با استاندارد ISO/TS 20281 [20] یا استاندارد مربوط به آزمون سمیت انجام شود. بهتر است، موارد زیر به‌طورخاص درنظر گرفته شود.

- داده‌ها به‌صورت جدول یا نمودار به‌طورکامل مستند شوند؛
- براساس نوع مقیاس داده یک روش آماری مناسب انتخاب شود؛
- همراه آزمون فرضیه، اندازهٔ توان آماری روش آزمون آماری انجام شده، آورده شود، برای مثال حداقل تفاوت قابل تشخیص (یا معنی‌دار) [24] و [25]؛
- همراه مدل‌سازی پاسخ غلظت یا رقت، بهتر است، حدود اطمینان (برای مثال حدود اطمینان ٪ ۹۵) برای EC_x یا LC_x گزارش شده محاسبه شود؛
- توصیه می‌شود که تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار آماری معتبر انجام شود.

۶ نمونه‌برداری و حمل و نقل

۶-۱ کلیات

نمونه‌برداری اولین گام در انجام بررسی‌های بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی است. هدف از نمونه‌برداری بهتراست، حصول یک نمونهٔ نمایانگر برای سوال تحقیق مدنظر و ارائهٔ آن به آزمایشگاه به روش صحیح باشد.

نمونه‌های محیطی به‌علت واکنش‌های فیزیکی، شیمیایی یا بیولوژیکی رخ داده بین زمان نمونه‌برداری و آنالیز مستعد تغییر هستند. اگر اقدامات احتیاطی لازم طی نمونه‌برداری، حمل و نقل و ذخیره‌سازی صورت نگیرد، ماهیت و میزان این واکنش‌ها اغلب به‌گونه‌ای است که نمونه می‌تواند به‌طور قابل ملاحظه‌ای تغییر کند و دیگر نمایان‌گر نمونهٔ اصلی نخواهد بود.

میزان این تغییرات وابسته به ماهیت شیمیایی و بیولوژیکی نمونه، جنس تجهیزات نمونه‌برداری (وسیلهٔ نمونه‌برداری و ظرف نمونه)، حمل و نقل و پیش‌تیمار (برای مثال ذخیره‌سازی، نگه‌داری) است. خطاهای ناشی از نمونه‌برداری و پیش‌تیمار نادرست نمونه، قابل اصلاح نیست.

این استاندارد در ارتباط با استاندارد ISO 5667-1 [14] در نظر گرفته شده است تا اصول کلی و راهنمایی را در طراحی برنامه‌های نمونه‌برداری و فنون نمونه‌برداری برای تمام جنبه‌های نمونه‌برداری از آب (از جمله فاضلاب، لجن، فاضلاب و رسوبات بستر)، برای مثال انتخاب نقاط نمونه‌برداری نمایان‌گر، زمان و تناوب

نمونه‌برداری، فنون نمونه‌برداری، تجهیزات نمونه را برای ویژگی‌های فیزیکی یا شیمیایی، اجتناب از آلودگی، حمل و نقل و نگه‌داری نمونه‌ها در آزمایشگاه، شناسایی و سوابق مربوط به نمونه‌ها، تنظیم کند.

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۳-۱۱۶۱۱ [۱] راهنمایی را برای تعیین پارامترهای فیزیکی- شیمیایی نمونه‌های نقطه‌ای یا مرکب که امکان آنالیز در محل آن‌ها وجود ندارد و بهتراست برای این منظور به آزمایشگاه منتقل شوند، ارائه می‌دهد. آن الزامات عمومی برای جابه‌جایی و نگه‌داری نمونه‌ها، حمل و نقل نمونه، پذیرش نمونه و شناسایی و هم‌چنین ذخیره‌سازی نمونه را تعیین می‌کند. به‌منظور حفاظت و جابه‌جایی لجن و رسوب، به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵-۱۱۶۱۱ [۳] مراجعه شود.

به‌طورکلی، رویکرد نمونه‌برداری برای انجام آزمون‌های زیستی با آنالیز شیمیایی سازگار است. در هر صورت، مشاوره با آزمایشگاه مجری آزمون زیستی به‌شدت توصیه می‌شود.

۶-۲ تجهیزات نمونه‌برداری

۶-۲-۱ کلیات

مقررات مربوط به تجهیزات نمونه‌برداری، به‌ویژه مواد مورد استفاده، هم برای ظرف نمونه‌برداری و هم برای ظروف نگه‌داری نمونه اعمال می‌شود. بهتر است، نوع ظرف و تجهیزات نمونه با هماهنگی آزمایشگاه آزمون‌کننده انتخاب شود زیرا در بعضی از آزمون‌های زیستی تنها مواد خاصی برای نمونه‌برداری، حمل و نقل و ذخیره‌سازی مناسب هستند. الزامات خاص مواد نمونه‌برداری شرح داده شده در استاندارد آزمون زیستی ملی یا بین المللی الزامی است.

۶-۲-۲ ظرف نمونه

انتخاب ظرف نمونه دارای اهمیت بسیاری است و برای کسب اطلاعات بیشتر در این زمینه به استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۳-۱۱۶۱۱[1] و ISO 5667-1 [14] مراجعه شود.

بیشتر دستورالعمل‌ها و توصیه‌های زیر از استاندارد ISO 5667-1 [14] آورده شده است.

بهتر است ظرف نمونه بر اساس حفظ ترکیب نمونه از هدررفت ناشی از جذب و تبخیر یا آلودگی با مواد خارجی طراحی شود. اغلب مشکلاتی که با آن مواجه هستیم شامل جذب مواد شیمیایی بر روی دیواره‌های ظرف نمونه‌برداری یا ظرف نمونه، آلودگی قبل از نمونه‌برداری ناشی از پاک‌سازی نامناسب ظرف نمونه‌برداری یا ظرف نگه‌داری نمونه و آلودگی نمونه به وسیلهٔ مواد تشکیل‌دهندهٔ ظرف نمونه‌برداری یا ظرف نگه‌داری نمونه است.

بهتر است، ظرف نمونهٔ مورد استفاده برای جمع‌آوری و ذخیرهٔ نمونه با توجه به مواردی مانند مقاومت در برابر دمای بالا، مقاومت در برابر شکستگی، سهولت درزبندی مناسب و باز شدن، اندازه، شکل، جرم، در دسترس بودن، هزینه، امکان تمیزکردن و استفادهٔ مجدد، انتخاب شود.

توصیه می‌شود، برای مواد حساس به‌نور از شیشهٔ جاذب نور استفاده شود. بهتراست، برای نمونه‌برداری از آب در دما و/یا فشار بالا یا هنگام نمونه‌برداری از مواد آلی کم‌مقدار، از فولاد زنگ‌نزن استفاده کرد.

علاوه‌بر ویژگی‌های فیزیکی موردنظر توصیف شده در بالا، توصیه‌می‌شود، ظروف نمونه مورد استفاده برای جمع‌آوری و ذخیرهٔ نمونه‌ها باتوجه‌به معیارهای غالب زیر (به‌ویژه هنگامی‌که ترکیبات مورد آنالیز با مقادیر جزئی وجود دارد) انتخاب شوند:

الف- به‌حداقل رساندن آلودگی نمونه به‌وسیلهٔ ماده‌ای که ظرف یا درپوش از آن ساخته شده است. به‌عنوان مثال، شستشوی مواد معدنی از شیشه (به‌خصوص شیشهٔ نرم) و ترکیبات آلی و فلزات از پلاستیک و الاستومرها (درپوش‌های وینیل پلاستیکی[1]، پوشش‌های پلی‌کلروپرن[2])؛

ب- قابلیت تمیزکردن و پاکیزه نگه‌داشتن دیواره‌های ظروف، به‌منظور کاهش آلودگی سطحی به وسیلهٔ اجزای کم‌مقدار مانند فلزات سنگین؛

پ- بی‌اثربودن موادی که ظرف از آن ساخته شده از نظر شیمیایی و زیستی، به‌منظور جلوگیری از واکنش بین اجزای نمونه و ظرف یا به‌حداقل رساندن آن؛

ت- هم‌چنین ظروف نمونه از طریق جذب عوامل شیمیایی اثرگذار می‌تواند موجب خطا شود. فلزات کم‌مقدار به‌طور ویژه‌ای در معرض این تاثیر هستند، اما سایر عوامل (مانند شوینده‌ها، آفت‌کش‌ها و فسفات) نیز می‌توانند در معرض این خطا قرار گیرند.

بهتراست، ظرف نمونه نسبت به گرمایش و انجماد مقاوم بوده و دارای قابلیت اتوکلاو و سهولت تمیزکردن باشد. ظروف پلی‌پروپیلن (PP)[3]، پلی‌تترافلورواتیلن (PTFE)[4] یا پلی‌اتیلن (PE)[5] مناسب هستند، اما پلی‌اتیلن قابل اتوکلاو نیست. به‌طورکلی (اما نه همیشه) بطری‌های شیشه‌ای برای ترکیبات شیمیایی آلی و گونه‌های زیستی مناسب هستند.

حجم، شکل و مواد ظروف نمونه به ماهیت نمونه، تعداد تکرارها، حجم موردنیاز برای آزمون‌های زیستی و ضرورت نگه‌داری و ذخیرهٔ نمونه‌ها قبل از فرآوری بیشتر بستگی دارد.

بهتر است حجم نمونهٔ جمع‌آوری شده برای آنالیزهای موردنیاز و هرگونه تکرار آنالیز، کافی باشد. استفاده از حجم خیلی کم نمونه می‌تواند موجب غیرنمایانگری نمونه‌های جمع‌آوری شده، شود. علاوه براین، نمونه‌های کوچک می‌تواند مشکلات جذب سطحی را نیز به‌دلیل نسبت بالای سطح به حجم افزایش دهند.

1- Cap liners
2- Polychloroprene jackets
3- Polypropylene
4- Polytetrafluoroethylene
5- Polyethylene

۶-۳ چگونگی پرکردن ظروف نمونه

برای به‌حداقل رساندن تاثیرات احتمالی بر نمونه، طی حمل و نقل، توصیه می‌شود، ظروف به‌طورکامل پر شود.

بهتراست، هنگام نگه‌داری به‌روش انجماد، ظروف نمونه تا حدی پر شود که امکان افزایش حجم را فراهم کند (برای جلوگیری از شکستگی).

مشکلات مربوط به پر شدن جزئی می‌تواند شامل موارد زیر باشد:

- افزایش به‌هم‌خوردگی در حین حمل و نقل که منجربه شکستن ذرات گرانوله می‌شود؛

- برهم‌کنش با فاز گازی، منجربه عاری‌شدن[1] (تشکیل لایهٔ جدید روی نمونه) می‌شود؛

- اکسیداسیون مواد، (به‌طور مثال) منجر به ته‌نشینی فلزات سنگین می‌شود.

اگر توصیه‌شده، ظروف نمونه به‌طورکامل پرشده، حمل و نقل شود، در آن صورت، کاهش حجم مربوط به انجماد پس از همگن‌سازی در آزمایشگاه انجام شود.

۶-۴ شناسایی و یادداشت مشخصات نمونه

بهتراست، ظروف نمونه به‌وضوح و منظم برچسب زده شود. به‌گونه‌ای که بتواند با نتایج تجزیه‌ای مرتبط شود.

توصیه می‌شود، یک شناسهٔ منحصر به فرد که حداقل دارای شمارهٔ نمونه، تاریخ و محل نمونه‌برداری است، بر روی برچسب ظرف نمونه باشد. سایر اطلاعات اضافی است و به اهداف برنامهٔ اندازه‌گیری خاص و الزامات آزمون زیستی بعدی بستگی دارد و می‌تواند در گزارش نمونه ذکر شود. بهتر است، برچسب‌های ظرف در برابر رطوبت، خشک کردن و انجماد مقاوم باشد و جدا نشود یا ناخوانا نباشد. بهتر است، سامانهٔ برچسب‌گذاری ضدآب باشد تا امکان استفاده در محل را فراهم نماید.

بهتر است، همواره برچسب‌ها یا فرم‌ها در زمان جمع‌آوری نمونه تکمیل شود.

۶-۵ زیرنمونه‌برداری[2]

زیرنمونه‌برداری می‌تواند به چند دلیل موردنیاز باشد: زیرنمونه‌برداری ضروری است، به‌طور مثال، برای نگه‌داری نمونه یا در مواردی‌که امکان انجام آزمون‌های زیستی به‌صورت موازی وجود ندارد یا درصورت نیاز به آزمون‌های مختلف که نمونه به‌نحوی خاص جابه‌جا و نگه‌داری می‌شود.

زیرنمونه‌برداری می‌تواند بلافاصله پس از نمونه‌برداری در محل، در آزمایشگاه قبل از انجام عملیات بیشتر یا پس از یخ‌زدایی، انجام شود. این زمان به سوال تحقیق بستگی دارد.

توصیه‌می‌شود، فرایند زیرنمونه‌برداری این اطمینان را فراهم آورد که زیرنمونه‌ها نمایان‌گر باقی می‌مانند. بهتراست، در فرایند زیرنمونه‌برداری، نمونه قبل از توزیع به‌طورکامل مخلوط شود. برای به‌دست‌آوردن زیر

1- Stripping
2- Sub-sampling

نمونه‌های با کیفیت یکسان، بهتر است، اطمینان حاصل شود که طی فرایند زیرنمونه‌برداری (برای مثال تکان دادن یا بهم زدن مداوم) همگنی نمونهٔ اصلی حفظ می‌شود. این مسئله به‌ویژه در مورد مخلوط‌های دو فازی، مانند آب‌های حاوی ذرات معلق دارای اهمیت است.

بهتر است، زیرنمونه‌های باقی‌مانده که به‌صورت منجمد، جداگانه ذخیره شده‌اند تا انتهای سنجش نهایی نگه‌داری شوند.

۶-۶ حمل و نقل

بهتراست نمونه‌ها پس از نمونه‌برداری بی‌درنگ به آزمایشگاه تحویل داده شوند.

طی حمل و نقل، ظرف نمونه را از یخ‌زدگی و انفجار، تماس با نور، افزایش دما و آلودگی خارجی محافظت کنید.

بهتراست، روش‌های خنک‌سازی یا انجماد (به زیربند ۷-۲ مراجعه شود) به‌منظور افزایش مدت زمان برای حمل و نقل و ذخیره‌سازی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. بهتر است، خنک کردن بلافاصله پس از نمونه‌برداری به‌عنوان مثال در جعبه‌های سرد با یخ (بدون یخ خشک)، بسته‌های ژل منجمد یا عناصر خنک‌کننده، شروع شود. یک دستگاه خنک‌کننده در وسیلهٔ نقلیه نیز مناسب است. دمای خنک‌کننده ۲ °C تا ۸ °C طی حمل برای بسیاری از کاربردها، مناسب در نظرگرفته می‌شود. دمای پیشنهادی برای اطراف نمونه (به‌عنوان مثال داخل جعبهٔ خنک‌کننده) بوده و برای خود نمونه کاربرد ندارد.

بهتر است، رویه‌های خنک‌کردن و انجماد به‌کار رفته با رویه‌های آزمایشگاه تجزیه مطابقت داشته باشد.

اگر نمونه‌ها به‌روش خنک‌کردن محافظت می‌شوند، فاصلهٔ زمانی بین نمونه‌برداری و آنالیز (زمان ذخیره‌سازی) باید در محدودهٔ زمان تعیین‌شده برای آزمون زیستی مربوطه باشد. به‌طورمعمول این مدت زمان ذخیره‌سازی ۴۸ h است.

برای کسب اطلاعات بیشتر، به استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۳-۱۱۶۱۱ [۱]، ۱۴-۱۱۶۱۱ [۲] و ۱۵- ۱۱۶۱۱[۳] مراجعه شود.

۷-۶ آلودگی طی نمونه‌برداری

جلوگیری از آلودگی طی نمونه‌برداری ضروری است. بهتر است، تمام منابع احتمالی آلودگی در نظر گرفته شوند و درصورت لزوم کنترل مناسب اعمال شود. منابع احتمالی آلودگی عبارتند از: پس‌ماندهٔ نمونه‌های قبلی باقی‌مانده در ظروف نمونه، قیف، قاشقک، اسپاتول و سایر تجهیزات، آلودگی حاصل از محل نمونه‌برداری طی نمونه‌برداری یا آلودگی کلاهک یا سر بطری‌ها، ناشی از گرد و غبار یا آب.

برای اطلاعات بیشتر، به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴-۱۱۶۱۱ [۲] مراجعه شود.

۶-۸ فنون کنترل کیفیت نمونه‌برداری

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۴-۱۱۶۱۱ [۲] راهنمایی را در زمینهٔ فنون کنترل کیفیت نمونه‌برداری ارائه می‌دهد. بعضی از این فنون در زیر آورده شده است:

- **نمونه‌های شاهد میدانی**

این روش می‌تواند برای شناسایی خطاهای مربوط به آلودگی ظروف نمونه و فرایند نمونه‌برداری استفاده شود. نمونه‌های شاهد میدانی، نمونه‌های شاهدی هستند که از آزمایشگاه به محیط برده می‌شوند و عملیات مشابه نمونه‌ها برروی آن‌ها انجام شده و به‌عنوان کنترل‌کنندهٔ روش‌های نمونه‌برداری مورد آنالیز قرار می‌گیرند.

- **بازیابی پالایه کردن**

از این روش می‌توان برای شناسایی خطاهای مربوط به آلودگی ظروف نمونه و فرایند نمونه‌برداری طی پالایه‌کردن نمونه‌ها استفاده کرد.

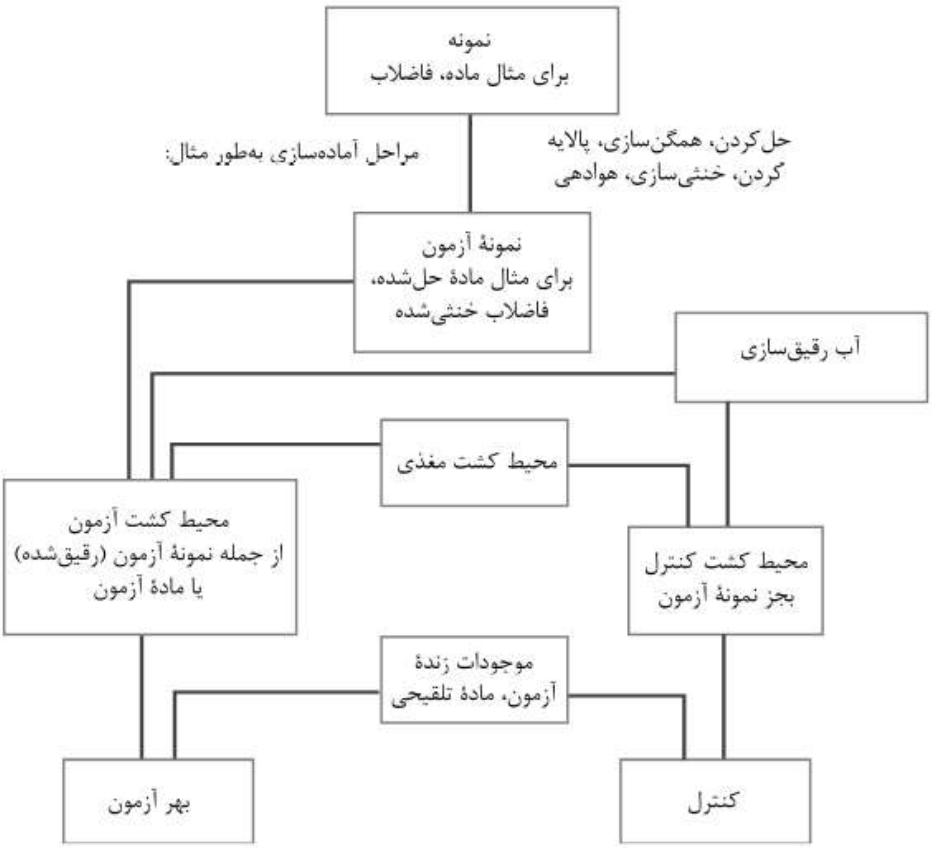
هنگام نیاز به پالایه کردن نمونه‌ها در محل یا در آزمایشگاه، بهتر است، شاهدهای میدانی و/یا نمونه‌های تضمین کیفیت استاندارد با استفاده از روش‌های مشابه پالایه‌کردن برای نمونه‌های واقعی، آماده‌سازی شوند.

۷ آماده‌سازی

۷-۱ کلیات

آماده‌سازی شامل تبدیل یک نمونه به نمونهٔ آزمونی همگن، در شرایط آزمایشگاهی برای بررسی‌های بعدی است.

طرح‌وارهٔ زیر (به شکل ۱ مراجعه شود) دارای اطلاعاتی دربارهٔ واژگان رایج (وگاهی اوقات متفاوت) به‌کار رفته در استانداردها و راهنماهای آزمون زیستی است.



شکل ۱- آماده‌سازی نمونه‌ها برای آزمون زیستی

۷-۲ محافظت و ذخیره‌سازی

بهتراست، نمونه‌های آزمون زیستی بلافاصله پس از جمع‌آوری پردازش شوند تا از تغییرات ناشی از واکنش‌های فیزیکی و شیمیایی و/یا فرایندهای زیستی اجزای اصلی جلوگیری شود.

در صورتی‌که انجام آزمون بلافاصله پس از نمونه‌برداری امکان‌پذیر نباشد، نمونه‌ها را در دمای ۲ °C تا ۸ °C خنک کنید. بهتراست، به‌منظور جلوگیری از رشد جلبک، نمونه‌ها در تاریکی نگه‌داری شوند. در صورت خنک‌سازی در این محدوده و ذخیره در تاریکی بیشتر نمونه‌ها تا ۴۸ h پایدار هستند.

در صورتی‌که شروع انجام آزمون در مدت ۴۸ h امکان‌پذیر نباشد، نمونه‌های آب را در اسرع وقت پس از نمونه‌برداری در دمای کمتر و مساوی ۱۸- °C منجمد کنید. بهتر است، زمان لازم برای انجماد و یخ‌زدایی با کاهش حجم نمونه، یعنی اندازهٔ ظرف نمونه، به‌حداقل برسد. به‌طورکلی، مطلوب است برای انجماد از ظروف یک لیتری (که حداکثر با ۰٫۵ l تا ۰٫۷ l از نمونه پر می‌شود) استفاده شود. برای آزمون‌هایی که نیاز به حجم بیشتری دارند، نمونه باید همگن و به زیرنمونه‌هایی تقسیم شود (به زیربند ۶-۵ مراجعه شود).

زمان ذخیره‌سازی تا دو ماه، بهترین روش برای بیشینه مدت نگه‌داری بیشتر آزمون‌های زیستی است.

استفاده از مواد نگه‌دارندهٔ زیست‌کش در آزمون زیستی حذف می‌شود. اضافه کردن اسیدها یا بازها با غلظت بالا برای تثبیت نمونه، مانند HCI یا NaOH نیز توصیه نمی‌شود. تجربه نشان داده است که کیفیت فاضلاب طی انجماد و یخ‌زدایی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. الزامات خاص نگه‌داری و ذخیره‌سازی نمونهٔ توصیف شده در یک استاندارد آزمون زیستی بین‌المللی یا ملی اجباری است. درصورت لزوم، روش و مدت ذخیره‌سازی برای هر نوع نمونه و روش آزمون زیستی باید به‌صورت جداگانه تعیین شود.

انجماد به‌صورت ویژه نیاز به کنترل دقیق فرایند انجماد و یخ‌زدایی برای بازگرداندن نمونه به حالت تعادل اولیه پس از یخ‌زدایی دارد.

روش توصیه شده برای حفظ نمونه‌های رسوب، این است که آنها را تا دمای ۱ °C تا ۵ °C خنک کرده و سپس در تاریکی ذخیره کنید (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۵-۱۱۶۱۱ [۳] مراجعه شود).

باید تأکید کرد که اگر شک و تردیدی وجود داشته باشد، مجریان آزمون‌های زیستی و شیمیایی باید قبل از تصمیم‌گیری در مورد روش جابه‌جایی و نگه‌داری نمونه‌ها با یکدیگر مشورت کنند. اگر فنون حفاظت برای آزمون‌های زیستی و آنالیز شیمیایی سازگار نباشد، بهتر است، برای مقاصد مختلف، زیرنمونه‌های جداگانه تهیه شوند.

۷-۳ یخ‌زدایی

نمونه‌های ذخیرهٔ یخ‌زده در روز آزمون به‌مدت کوتاهی قبل از استفاده، یخ‌زدایی می‌شوند. حمام آب گرم تا دمای °C ۲۵، همراه با تکان دادن ملایم، برای جلوگیری از گرمای بیش از حد توصیه می‌شود. به‌طور متناوب، نمونه را می‌توان در تاریکی در دمای بین °C ۲ تا °C ۸ در طول یک شب ذوب کرده و به‌طور مستقیم برای آزمون مورد استفاده قرار داد.

یخ‌زدایی کامل نمونه قبل از استفاده از آن ضروری است، زیرا فرایند انجماد می‌تواند منجر به انباشت برخی اجزای جزئی در بخش داخلی نمونه شود که در آخر منجمد شده است. از روش مایکروویو برای یخ‌زدایی نمونه استفاده نکنید. برای انجام آزمون‌های زیستی، یک نمونهٔ ذوب شده نباید تا آزمون در روزهای بعد دوباره یخ ببندد یا در یخچال نگه‌داری شود.

۷-۴ همگن‌سازی

از توزیع یکنواخت تمام اجزای محلول و ذرات باید اطمینان حاصل کرد (به‌عنوان مثال با تکان دادن ملایم یا شدید). توصیه می‌شود، در این مرحله به احتمال هدررفت مواد فرار توجه بیشتری کرد. آماده‌سازی اولتراسونیک (فراصوت) یا پراکندگی مکانیکی با سرعت بالا (مانند همگن‌کننده) برای نمونه‌های محیطی به کار نمی‌رود. زیرا این نمونه‌ها با استفاده از این روش‌ها به‌ویژه در حضور ذرات معلق به‌طورقابل‌توجهی می توانند تغییر کنند. برای مواد محلول ضعیف، به زیربند ۱۰-۲ مراجعه شود.

توصیه می‌شود به‌عنوان یک قاعدهٔ کلی، توجه داشت که وضعیت اولیهٔ نمونه، بازسازی شود یا حداقل تا حد امکان کمترین تغییر در آن داده شود.

۷-۵ جداسازی محلول و ذرات معلق

به‌طورکلی، آزمون‌های زیستی با نمونهٔ اصلی انجام می‌شود. با این‌حال، در برخی موارد، مقدار زیاد ذرات معلق، لجن و رسوب در سیستم‌های آزمون آبی با موجودات موردنیاز آزمون تداخل ایجاد می‌کنند (برای مثال گرفتگی آبشش ماهی‌ها، اختلال در تغذیه پلانکتون‌ها و محدودیت نوری جلبک‌ها).

وجود ذرات زمینه‌ای بالا می‌توانند اندازه‌گیری‌ها را مختل کنند (برای مثال هنگام استفاده از شمارندهٔ ذره یا اسپکتروفتومتر). شمارش میکروسکوپی نیز به شدت آسیب می‌بیند. دوزدهی مداوم از طریق بستن و انسداد لوله‌ها غیرقابل اطمینان است.

اگر این اثرات زیان‌آور نباید در نتایج آزمون منعکس شود، می‌توان با روش‌های مختلفی مانند پالایه کردن یا سانتریفیوژ از چنین مزاحمت‌هایی جلوگیری کرد.

بااین‌حال، پالایه کردن، سانتریفیوژ و سایر روش‌های جداسازی، این خطر را به‌همراه دارد که اجزای فعال، متصل به ذرات، قبل از آزمون حذف شوند. علاوه‌براین، مشکلات مربوط به پالایه کردن (به‌عنوان مثال جذب و آب‌شویی جنس پالایه) باید مورد توجه قرار گیرد. ترسیب و سانتریفیوژ این مشکلات را برطرف می‌کند. به‌طورکلی، سانتریفیوژ (به‌عنوان مثال ۱۰ min در ۱۵۰۰ g ± ۴۵۰۰ g) برای پالایه کردن، ارجح است.

انجام آزمون‌ها در محیط آبی در حضور ذرات باعث مشکلات جدی می‌شود. بنابراین بهتر است، نمونه به مدت ۳۰ min تا ۲ h ته‌نشین شود. مقدار مورد نیاز مایع بالای رسوب را می‌توان با استفاده از یک پیپت نمونه‌برداری کرد. نوک پیپت باید در مرکز ظرف و وسط مایع بالای رسوب قرار گیرد. روش دیگر جداسازی ذرات ناخالص درشت، عبور دادن نمونه از پالایه با اندازهٔ درشت (بزرگتر از ۵۰ µm) است. تودهٔ ذرهٔ جدا شده می‌تواند به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد.

بهتر است، جنس پالایه از مواد بی‌اثر باشد و پالایه‌ها نیز قبل از استفاده با آب با خلوص بالا شسته شده تا احتمال آلودگی مواد آزمون با بقایای سمی را کاهش دهد. پالایه‌ها را از لحاظ وجود بقایای سمی از طریق پالایه کردن آب رقیق‌سازی یا محیط کشت با آزمون بعدی در آزمون زیستی بررسی کنید. جذب مواد آزمون را می‌توان به‌وسیلهٔ پالایه‌های از پیش آماده‌سازی شده با محلول‌های مربوطهٔ مواد آزمون کاهش داد. پالایه کردن را می‌توان تحت فشار یا در خلاء انجام داد.

برخی از روش‌های آزمون امکان تعیین ضریب اصلاح برای پارامترهایی مانند کدورت فراهم می‌کند.

نمونه‌های آب غنی از باکتری در آزمون‌های مرتبط با فعالیت باکتریایی مزاحمت ایجاد می‌کنند مانند مهار تنفس. مزاحمت ناشی از فعالیت باکتریایی در نمونه می‌تواند حداقل به‌صورت جزئی، از طریق اجرای کنترل‌های مناسب، برآورد شود. هنگام آزمون برخی از جلبک‌ها، تخم‌ها و نوزاد یا کشت‌های سلولی، ممکن است عفونت‌های باکتریایی مزاحمت ایجاد کنند. روش‌های موجود برای سترون کردن، مانند روش‌های حرارتی، اشعهٔ UV یا پالایه کردن غشایی (۰٫۲ µm) همگی دارای احتمال اثرات جانبی هستند. اگر پالایه کردن ضروری باشد، پالایه‌های شیشه‌ای ترجیح داده می‌شوند.

در روش‌هایی که پیش‌تغلیظ نمونه انجام می‌شود (به زیربند ۷-۶ مراجعه شود)، پالایه‌کردن نمونه‌ها اجباری است. زیرا ممکن است ذرات، کارتریج را مسدود کرده و مانع از استخراج موفقیت‌آمیز شوند. برای این‌منظور، پالایه‌های الیاف شیشه‌ای[1] با اندازهٔ منفذ حدود ۱ µm مناسب هستند.

توصیه می‌شود، هر روش استفاده شده برای جداسازی ذرات در گزارش آزمون درج شود.

۷-۶ پیش‌تغلیظ

۷-۶-۱ کلیات

برای روش‌های خاص (به‌عنوان مثال تعیین روابط علت و معلول برای ارزیابی خطر آلودگی محیط‌زیستی یا ارزیابی مقایسه‌ای نمونه‌ها)، آزمون نمونه‌های پیش‌تغلیظ شده یا بخش‌هایی از آن همراه با آزمون‌های زیستی در ترکیب با تجزیهٔ شیمیایی یک روش رایج است.

اگر تنها غلظت‌های بسیار کم آلاینده‌ها در نمونهٔ محیطی وجود داشته باشد یا اگر بعضی از آزمون‌های زیستی خاص در شرایط درون‌تنی استفاده شود، یک نمونهٔ پیش‌تغلیظ شده می‌تواند مناسب باشد. به‌ویژه، غنی‌سازی نمونه‌های آب امکان تشخیص مواد در غلظت‌های پایین را با استفاده از آزمون‌های زیستی خاص در شرایط درون‌تنی کوتاه مدت فراهم می‌آورد.

پیش‌تغلیظ نمونه‌ها می‌تواند نه تنها غلظت مواد مضر، بلکه سایر ترکیبات آب را نیز افزایش دهد. ممکن است این ترکیبات در غلظت‌های بالاتر درآزمون زیستی مزاحمت ایجاد کنند.

پیش‌تغلیظ به‌طورمعمول شامل روشی است که در آن گستره‌ای از ترکیبات به‌طور انتخابی از یک نمونه (یعنی استخراج) غنی می‌شود. در این روش، اجزای ماتریکس مانند نمک‌ها (برای مثال مواد مغذی که می‌تواند سمیت نمونه‌ها را پنهان کند) و هم‌چنین سایر ترکیبات بالقوهٔ سمی مانند فلزات، ممکن است از نمونه خارج شوند [27]. لازم است توجه داشته باشیم که پیش‌تغلیظ انتخابی است. میزان این گزینش‌پذیری به‌روش مورد استفاده بستگی دارد.

بهتر است در نظر داشت که تا به امروز امکان برون‌یابی اثرات مزمن نمونهٔ اصلی از اثراتی که در آزمون‌های حاد با نمونه‌های پیش‌تغلیظ شده اندازه‌گیری می‌شوند، میسر نیست. برون‌یابی مستلزم کالیبراسیون خیلی دقیق روش استخراج و آزمون زیستی کوتاه‌مدت است که نشان دهندهٔ سمیت حاد باشد. تاکنون مثال مناسبی برای این چنین برون‌یابی گزارش نشده است.

در صورت استفاده از روش پیش‌تغلیظ (چنان‌چه روش حساسی برای آزمون نمونهٔ اصلی وجود نداشته باشد)، بهتر است، نتایج حاصل از نمونهٔ پیش‌تغلیظ با احتیاط تفسیر شود. ارتباط این نتایج با نمونهٔ اصلی به‌دلایل زیر دشوارتر هستند:

۱- میزان انتخاب‌گری پیش‌تغلیظ که رخ داده است؛

1- Glass fibre filters

۲- فاکتور غلظت مورد استفاده.

۷-۶-۲ روش‌های استخراج

الگوی اجزای اصلی ترکیب آب طی پیش‌تغلیظ تغییر می‌کند. به‌عنوان مثال:

استخراج مایع/مایع با حلال‌های آلی و استخراج فاز جامد از طریق جذب در جامدات (برای مثال کارتریج C18) برای آلاینده‌های آلی بسیار کارآمد است. قدرت یونی و فشار اسمزی نمونه می‌تواند کاهش یابد. یون‌های سمی و سایر عناصر تشکیل دهندهٔ آب که احتمالا به اثر (برای مثال پوشاندن آن) کمک می‌کند، مانند اسیدهای هومیک، می‌تواند حذف شود؛

تبخیر و خشک کردن انجمادی و جاذب استخراج می‌تواند منجربه هدررفت مواد فرار شود. تبخیر و خشک کردن انجمادی هم‌چنین قدرت یونی و فشار اسمزی را افزایش می‌دهد؛

- الترافیلتراسیون[1] می‌تواند منجربه هدررفت مولکول‌های کوچک شود که در غشاء نفوذ کرده است.

اگر غلظت یک ترکیب خاص بیش از حلالیت آن افزایش یابد، ممکن است ته‌نشینی یا لخته‌شدن مواد محلول قبلی رخ دهد.

برخی از مواد تشکیل‌دهندهٔ نمونه آب تغلیظ شده می‌تواند در مقایسه با نمونهٔ اولیه وارد واکنش‌های شیمیایی با سرعت بالاتر شوند.

توصیه می‌شود، چنین مسائلی قبل از انتخاب روش استخراج، به‌طور کامل ارزیابی شود. برای اطلاعات بیشتر در این زمینه به منابع شمارهٔ [27] و [28] کتاب‌نامه مراجعه شود.

۷-۷ تنظیم pH

انتخاب مقدار pH که در آن نمونه باید تنظیم شود، تابع هدف آزمون و الزامات فیزیولوژیکی موجود زندهٔ آزمایشگاهی است.

در بسیاری از آزمون‌های زیستی، نمونه‌های با مقدار $۶ \leq pH \leq ۹$ می‌توانند بدون تنظیم pH آزمون شوند. مقادیر pH بین ۶ تا ۹ (که به‌طور معمول برای آبزیان قابل تحمل است) امکان یونیزه شدن سموم را فراهم می‌کند که درغیراین‌صورت از طریق pH خارج از این محدوده، پوشیده می‌شود.

توصیه می‌شود، نمونه‌های با مقادیرpH خیلی بالاتر از محدودهٔ تحمل بیشتر موجودات زندهٔ آزمون (به‌طور معمول$pH < ۶$ یا $pH > ۹$، با توجه به موجود زنده) در $pH= ۷٫۰ \pm ۰٫۲$ تنظیم شود. توصیه می‌شود، محدوده‌های فیزیولوژیکی موجودات زنده در استانداردهای مربوطه تعریف شود. بهتر است از تجاوز از مقدار pH خنثی اجتناب شود.

بهتر است، غلظت اسید یا باز موردنیاز برای تنظیم به‌گونه‌ای باشد که تغییر حجم تا حد امکان کم باشد.

1- Ultrafiltration

بهتر است، اضافه کردن اسید یا باز منجر به ته‌نشینی و تشکیل کمپلکس نشود. هنگامی‌که مواد از محیط آزمون خارج می‌شوند، دسترسی زیستی آن‌ها کاهش می‌یابد. توصیه می‌شود، اضافه کردن اسید یا باز منجر به اثرات جانبی بر موجودات زندهٔ آزمون نشود. به‌طور معمول، محلول‌های اسید هیدروکلریک یا هیدروکسید سدیم توصیه می‌شود.

در صورتی که اثر pH در نتیجهٔ آزمون باید انعکاس یابد یا اگر تغییرات فیزیکی یا واکنش‌های شیمیایی (به‌عنوان مثال ته‌نشینی) به دلیل تنظیم pH مشاهده شود، توصیه می‌شود، تنظیم حذف شود.

۸ دستگاه‌ها و تجهیزات

۸-۱ انتخاب دستگاه‌ها

نوع، شکل و جنس تجهیزات فنی به آزمون و ماهیت نمونه بستگی دارد. بهتر است، تمام موادی که با نمونهٔ آزمون در تماس است، به‌گونه‌ای باشد که مزاحمت ایجاد شده از طریق جذب یا انتشار مواد آزمون، شستشوی مادهٔ خارجی (برای مثال روان‌کننده‌ها) یا رشد موجودات زنده را، به‌حداقل برساند. مواد بی‌اثر مانند شیشه، پلی تترافلوئورواتیلن (PTFE)، فولاد زنگ‌نزن مناسب هستند. توصیه می‌شود، اتصالات لوله تا حد امکان کوتاه باشد و هر چند وقت یک‌بار تعویض شود. به‌منظور کاهش آب‌شویی روان‌کننده‌ها یا سایر مواد خارجی حاصل از مواد، لوله‌های جدید باید قبل از استفاده چندین بار آبکشی شوند. بهتر است، از آلودگی مواد آزمون (برای مثال از طریق ساییدگی روغن توپی‌ها یا اتصالات) اجتناب شود. لوله‌های ساخته شده از مس، آلیاژ مس یا پلاستیک‌های واکنش‌دهنده، مناسب نیستند.

۸-۲ تمیز کردن دستگاه‌ها و تجهیزات

بهتر است، دستگاه‌ها و تجهیزات قبل از استفاده با مواد پاک‌کنندهٔ مناسب برای مثال اسید هیدروکلریک، هیدروکسید سدیم، شوینده‌ها، حلال‌ها (اتانول، استون، متانول)، اسید سولفوریک/پراکسیدهیدروژن و در صورت لزوم با روش حرارتی یا شیمیایی، به‌عنوان مثال با محلول هیپوکلریت، استریلیزه و تمیز شوند. بهتر است، از کروموسولفوریک اسید استفاده نشود.

شستشوی مجدد دستگاه‌ها با آب مقطر (یا آب با همان درجهٔ خلوص)، تضمین می‌کند که هیچ آثاری از عامل تمیزکننده یا ضدعفونی‌کننده باقی نمانده است.

قبل از شستشوی نهایی با آب مقطر، برای حذف آثار مواد مورد استفادهٔ قبلی، شستشوی اسید توصیه می‌شود.

۹ اختلال در عملکرد آزمون

۹-۱ مشکلات و اقدامات پیش‌گیرانه برای نمونه‌های حاوی مواد قابل حذف

۹-۱-۱ کلیات

دلایل مختلف به‌شرح زیر می‌تواند موجب هدررفت اجزای نمونهٔ آب از سسیتم آزمون شود:

- تبخیر مواد فرار؛

- کف‌کردن عوامل فعال سطحی؛

- جذب به پالایه‌ها یا مواد ظرف، به‌ویژه در مورد مواد آب‌گریز؛

- ته‌نشینی؛

- لخته‌شدن؛

- تجزیهٔ زیستی؛

- تخریب غیرزیستی (مانند هیدرولیز و فوتولیز)؛

- جزءبندی یا اتصال ضعیف در مورد استخراج مایع- مایع یا استخراج با جاذب.

در این موارد، بخش‌های مادهٔ به‌کار رفته در سیستم‌های آزمون برای موجودات زنده در طول آزمون در یک سطح ثابت قابل استفاده نیست.

بااین‌حال، هدررفت مواد طی آزمون زیستی می‌تواند فقط ناشی از جذب و تجمع در موجودات زندهٔ آزمون یا جذب در ذرات مواد غذایی باشد. دراین‌صورت، موجودات زنده می‌توانند به‌طور قابل ملاحظه‌ای در معرض قرار بگیرند، اگر چه فقط بخشی از ماده را می‌توان به‌صورت تجزیه‌ای در آب تعیین کرد. با آنالیزهای مقایسه‌ای بهرها با و بدون موجودات زنده و تغذیه می‌توان مشخص کرد که چگونه هدررفت‌های مادهٔ واقعی یا شبیه‌سازی شده اتفاق می‌افتد.

شواهدی از موجودات زندهٔ میکروسکوپی (مانند جلبک‌ها، باکتری‌ها) وجود دارد که حساسیت سیستم آزمون با افزایش تراکم موجودات زنده کاهش می‌یابد. علاوه‌براین، نسبت موجودات زندهٔ آزمون یا سلول‌ها به حجمی که در معرض قرار دارد، هدررفت بالقوهٔ ترکیبات از نمونه را، به‌ویژه برای ترکیبات چربی‌دوست تعیین می‌کند. هدررفت مواد را می‌توان از طریق اعمال دوزهای بعدی یا بهتر از آن با استفاده از سیستم‌های نیمه ساکن یا جاری به‌منظور جلوگیری از تجمع متابولیت‌ها در سیستم آزمون، جبران نمود.

۹-۱-۲ تبخیر

به‌ویژه در روش‌های آزمونی که باید در سیستم‌های باز انجام شوند یا نیاز به هوادهی دارند، مواد فرار به‌سرعت از سیستم آزمون جدا می‌شوند. در چنین مواردی، بهتر است، از سیستم‌های آزمون بسته یا جاری استفاده کرد (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۸ [۷] مراجعه شود). لازم است در نظر داشت که در مواردی مانند آزمون مهار تکثیر سلولی باکتری یا جلبک، بهتر است، تبادل کافی گاز تضمین شود.

مواد فرار نه تنها از سیستم آزمون خارج می‌شود بلکه از یک بهر آزمون می‌توانند به بهرهای آزمون دیگر بروند و بهرهای آزمون با غلظت بالا می‌تواند بهرهای آزمون با غلظت کم را تحت تاثیر قرار دهد. بهتر است، این مسئله هنگام انکوباسیون بهرهای آزمون در یک انکوباتور یا هنگام کار با میکروپلیت‌ها مورد توجه قرار

گیرد. توصیه می‌شود، در مورد مواد سمی فرار، اطمینان حاصل شود که هیچ خطری برای مجریان آزمون وجود ندارد.

۹-۱-۳ کف کردن

مواد فعال سطحی که روی سطح یک مایع تجمع یافته و هنگام هوادهی بهر آزمون تمایل به تشکیل حباب دارد.

با افزایش نسبت سطح به حجم (محفظه‌های مسطح آزمون) یا، در صورت امکان با استفاده از یک هواکش برای ایجاد مکش در سطح، اکسیژن لازم بدون تشکیل کف تامین می‌شود.

استفاده از مواد ضدکف منجربه برهم‌کنش غیرقابل پیش‌بینی با نمونهٔ آزمون می‌شود و به‌طورکلی بهتر است، به‌جز در موارد خاص (به‌عنوان مثال مطالعات تجزیهٔ زیستی) از به‌کارگیری آن‌ها اجتناب شود.

۹-۱-۴ جذب سطحی

مواد آب‌گریز می‌توانند روی دیواره‌های ظرف جذب سطحی شوند و به‌ویژه در غلظت‌های پایین دیگر به‌طور کامل قابل دسترس زیستی نیستند. به‌منظور جلوگیری از هدررفت‌های زیاد مواد، می‌توان پیش از آزمون ظروف و ابزارهای پیپت کردن و انتقال را با نمونه در غلظت پیش‌بینی‌شده پیش‌انکوباسیون کرد. پس از انجام پیش انکوباسیون و به‌منظور آماده‌سازی بهر آزمون، بهتر است، نمونه دورریخته و یک نمونهٔ تازه جایگزین شود.

۹-۱-۵ ته‌نشینی/لخته‌سازی

آب، فاضلاب و مایعات/جامدات آلی و معدنی ممکن است دارای اجزایی باشند که ترکیب را در بهرهای آزمون تغییر دهد (با ته‌نشینی یک مادهٔ مغذی محدودکننده، تشکیل کمپلکس عناصر ضروری، افزودن مواد مغذی) و در نتیجه موجب اثراتی روی موجود زندهٔ آزمون (به‌عنوان مثال رشد جلبک‌ها) شود که ارتباطی با اجزای سمی ندارد. برای کسب اطلاعات بیشتر، به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۸ [۷] مراجعه شود.

۹-۱-۶ تجزیه

مواد تشکیل‌دهنده ممکن است در طول آزمون تحت تاثیر انواع مختلف تجزیه، یعنی تجزیهٔ زیستی، هیدرولیزی یا تجزیهٔ نوری قرار گیرند. این مسئله می‌تواند منجر به تشکیل محصولات ثانویه (متابولیت‌ها) شود که سمیت آن با محصول اصلی متفاوت است. در ارتباط با مدت زمان آزمون، به‌عنوان مثال، تغییر شکل یک نمونهٔ محیط‌زیستی، کم و بیش پیچیده بوده و یک عامل پذیرفته شده در آزمون‌های زیستی است. به‌طورمعمول جلوگیری از تجزیهٔ‌زیستی در سیستم‌های آزمون استاتیک، غیرممکن است.

برخی از مواد تشکیل‌دهنده (مانند ایزوسیانات، استرها و انیدریدها) در آب هیدرولیز می‌شوند. این بدان معنی است که در طول آزمون، موجودات زنده به‌طور فزاینده‌ای در معرض محصولات تجزیه قرار می‌گیرند. در مورد هیدرولیز، مقدار pH می‌تواند تغییر کند که گاهی منجربه تغییر در میزان هیدرولیز می‌شود.

بعضی از مواد تشکیل‌دهنده (مانند هگزاکلروسیکلوپنتادی‌ان[1]، EDTA [2] و هگزاسیانوفرات[3]) در معرض نور تجزیه می‌شوند. در مورد آزمون‌های زیستی که مستلزم تابش نور به موجودات زندهٔ آزمون (برای مثال آزمون‌های جلبک‌ها) باشد، اثر نور جزء ذاتی سیستم است.

۹-۲ مشکلات و اقدامات پیش‌گیرانه در نمونه‌های رنگی و/یا کدر

در برخی از آزمون‌های زیستی آبی، تعیین نقطهٔ پایانی براساس اندازه‌گیری طیف‌سنجی (نورسنجی[4]، فلورسانس سنجی[5]) صورت می‌گیرد. در مورد نمونه‌های با شدت رنگ بسیار بالا یا کدر، اثر بازدارندگی ایجاد شده را نمی‌توان با اطمینان تعیین کرد. برای غلبه بر این وضعیت مراحل زیر می‌تواند انجام شود:

- روش متفاوت برای تعیین نقطهٔ پایانی (به‌عنوان مثال شمارش سلول به جای اندازه‌گیری کدورت در آزمون جلبک)؛
- اندازه‌گیری کدورت ناشی از موجودات زنده با استفاده از یک یا دو طول موج متفاوت (رنگ‌ها اغلب دارای ویژگی‌های طول موج مختلف نسبت به پراکندگی نور ایجاد شده توسط موجودات زندهٔ میکروسکوپی هستند).
- ترکیب با یک روش مناسب دیگر (مانند اندازه‌گیری میزان اکسیژن مصرفی یا تولیدشده در پایان آزمون بازدارندگی تکثیر سلولی)؛ در این مورد، محیط کشت مغذی باید تجدید شود؛
- تعیین تأثیر در نتیجه رنگ و/یا کدورت به کمک اندازه‌گیری یا ظروف آزمون ترکیبی که در آن نمونهٔ آزمون و موجودات زنده از هم جدا هستند (برای مثال سل تصحیح رنگ در آزمون نورسنجی باکتری‌ها).

۱۰ آماده‌سازی محلول‌های مادر و بهرهای آزمون

۱۰-۱ مواد محلول در آب

توصیه می‌شود، هنگام تهیهٔ محلول مادر، مقدار مادهٔ وزن‌شده بیش از حداکثر مقداری نباشد که حل می‌شود (< غلظت اشباع). با تکان دادن و/یا گرم‌کردن، سرعت حل‌شدن (انحلال) را می‌توان افزایش داد. با این وجود، بهتر است این امر منجربه هدررفت مواد یا تجزیهٔ حرارتی نمونه نشود.

۱۰-۲ مواد کم محلول

۱۰-۲-۱ کلیات

سازمان همکاری و توسعهٔ اقتصادی (OECD)[1] [22] راهنمایی را به‌منظور آزمون سمیت آبزی و ارزیابی مواد و مخلوط‌های سخت توسعه داده است. بهتر است، مواد با انحلال‌پذیری کمتر از ۱۰۰ mg/l در آب به‌عنوان

1- Hexachlorocyclopentadiene
2- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
3- Hexacyanoferrate
4- Photometry
5- Fluorometry

کم‌محلول در نظر گرفته شود. هنگام بررسی مواد کم‌محلول، اطمینان حاصل کنید که هیچ ماده‌ای به‌صورت رسوب، ذرات شناور یا به‌شکل پراکنده، حل‌نشده باقی نمی‌ماند. از این‌رو، برای اطمینان از نتایج تجدیدپذیر، باید از روش‌هایی استفاده کرد که بهترین توزیع همگن از ترکیب آزمون را در بهر آزمون تضمین می‌کند.

۱۰-۲-۲ آزمون در محدودهٔ حلالیت در آب

برای این منظور، یک بخش توزین شدهٔ معین از ماده (به‌عنوان مثال ۱۰۰ mg) را از طریق هم‌زدن یا تکان دادن با یک لیتر آب مقطر یا به‌طور ترجیحی در محیط آزمون (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۸ [۷] مراجعه شود)، مخلوط می‌شود به‌عنوان مثال به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h، در تاریکی و در دمای موردنظر آزمون، مطابق با حلالیت و پایداری ترکیب آزمون. توجه داشته باشید که سازمان همکاری و توسعهٔ اقتصادی (OECD) [22] توصیه می‌کند که حداکثر غلظت برای آماده‌سازی محیط آزمون با افزودن مستقیم باید کمتر از ٪۵۰ حلالیت آب باشد. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۸ [۷] توصیه می‌کند که برای تهیهٔ یک محلول اشباع، حداقل مقدار لازم مورد استفاده قرار گیرد تا از افزایش ناخالصی‌هایی که حلالیت بالاتری دارند جلوگیری شود. بهتر است، بخش توزین‌شده برای تهیهٔ غلظت آزمون نشان‌دار شود. پس از جداسازی فاز، فاز نامحلول به‌طور کامل از طریق پالایه کردن (در صورت لزوم با استفاده از یک پالایهٔ غشایی، با اندازهٔ منافذ m μ ۰٫۲ تا μm ۰٫۴۵) یا به‌طور ترجیحی از طریق سانتریفیوژ جدا می‌شود. سری رقت با فاز آبی تهیه می‌شود.

برای رسیدن به غلظت اشباع روش‌های مختلف مکانیکی و شیمیایی مانند خردکننده با تابش امواج صوتی با سرعت بالا، افزایش دما، تنظیم pH، استفاده از حلال‌های فرار و امتزاج‌پذیر غیرآبی که پس از اعمال دوز یا انحلال ماده در حلال امتزاج‌پذیر آبی غیرسمی بخار می‌شوند و جذب ماده روی حامل خنثی وجود دارد. هرچند لازم به یادآوری است که برای تهیهٔ محلول‌های اشباع استفاده از ابزارهای مکانیکی ترجیح داده می‌شود. بهتر است، تنها در موارد استثنائی از مواد شیمیایی (اسید، باز، حلال) استفاده شود و نیز باتوجه به OECD [22]، استفاده از حلال‌ها به‌شرایطی محدود شود که هیچ روش قابل‌قبول دیگری برای آماده‌سازی محیط به‌دلیل احتمال برهم‌کنش با مادهٔ آزمون که منجربه پاسخ متفاوتی در آزمون شود، وجود ندارد. در صورت استفاده از حلال، نیاز است تا اثرات آن بر نتایج آزمون‌ها از طریق کنترل‌های مناسب (کنترل حلال یا حامل) تعیین شود تا در طرح آزمون گنجانده شود. بهتر است حداکثر حجم حلال کمتر از ml/l ۰٫۱ باشد. سازمان همکاری و توسعهٔ اقتصادی (OECD) [22] و استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۸ [۷] برخی اصول استفاده از حلال را مدنظر قرار داده‌اند.

در مطالعات تجزیهٔ ماده، مواد کم‌محلول را نیز می‌توان در محدوده‌ای بالاتر از حد حلالیت و با اعمال مستقیم دوزی از وزن یا حجم مناسب آن آزمون کرد. استفاده از حامل‌های خنثی مانند فیلم‌های پلی‌اتیلنی یا لام‌های میکروسکوپی یا استفاده از حلال‌های غیرقابل‌تجزیه (مانند دی متیل سولفوکسید) می‌تواند میزان توزیع بالاتری از مادهٔ نامحلول و سطح تماس بزرگ‌تری بین موجودات زندهٔ میکروسکوپی و ماده ایجاد کند. برخی از آزمون‌های مناسب تجزیه‌پذیری زیستی در استاندارد ISO/ TR 15462 [21] شرح داده شده است.

1- Organisation for Economic Co-operation (OECD)

۱۰-۲-۳ پراکندگی‌ها و امولسیون‌ها

سازمان همکاری و توسعهٔ اقتصادی (OECD) [22] آزمون پراکندگی‌ها و امولسیون‌های آبی را به‌دلایل زیر توصیه نمی‌کند:

- اثرات مشاهده شده در آزمون‌های سمیت به‌طور معمول بهترین توصیف را دربارهٔ غلظت‌های مواجهه مواد آزمون محلول به‌دست می‌دهند؛
- وجود مادهٔ نامحلول مشکلات قابل‌توجهی را در تعیین غلظت‌های مواجهه ایجاد می‌کنند؛
- احتمال بروز اثرات فیزیکی مادهٔ نامحلول موجود در محیط آزمون بر موجودات زندهٔ آزمون وجود دارد که به سمیت وابسته نیست.

با این‌حال، با وجود الزام قانونی مانند ارزیابی مواد پراکنده‌کنندهٔ نفتی یا آزمون محصولات فرموله‌شده، آزمون امولسیون‌ها می‌تواند انجام شود. هم‌چنین مواد آزمونی که تمایل ذاتی به تشکیل یک پراکندگی یا امولسیون آبی دارند مانند عوامل فعال سطحی و شوینده‌ها، می‌توانند در امولسیون‌ها آزمون شوند.

پراکندگی‌ها یا امولسیون‌های پایدار گاهی می‌توانند با استفاده از ترفند سادهٔ اختلاط فیزیکی مواد آزمون با فاز آبی، تولید شوند. به‌طور کلی، استفاده از پراکنده‌کننده‌های شیمیایی یا عوامل امولسیون‌کننده به‌علت احتمال برهم‌کنش‌های فیزیکی- شیمیایی تاثیرگذار روی سمیت ظاهری مادهٔ آزمون، توصیه نمی‌شود. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۸ [۷] برخی از توصیه‌های عملی را هنگام استفاده از عوامل پراکنده‌کننده یا امولسیون‌ساز توصیف می‌کند.

۱۰-۲-۴ مشکلات ویژهٔ مخلوط‌های مواد یا محصولات فنی

مخلوط‌هایی که دارای ترکیب پیچیده‌ای از مواد مجزا با حلالیت و خواص فیزیکی- شیمیایی مختلف هستند، به‌عنوان «مخلوط‌های پیچیده» نامیده می‌شوند. سازمان همکاری و توسعهٔ اقتصادی (OECD) [22] رویکردهای مختلفی را برای آماده‌سازی محیط و/یا آزمون مواد چندجزئی توصیف می‌کند. سمیت مواد چندجزئی پیچیده که حلالیت جزئی در آب دارند را می‌توان با تهیهٔ اجزای سازگار با آب (WAF)[1] تعیین کرد که فقط حاوی یک بخش از مواد چندجزئی است که در آب حل می‌شود و/یا به‌عنوان پراکندگی یا امولسیون پایدار حضور دارد.

WAFs به‌صورت جداگانه آماده می‌شوند و نه از طریق تهیهٔ سری رقت از WAF مادر. مواد چندجزئی به‌طور مستقیم به آب افزوده شده و به‌مدت زمان کافی برای رسیدن به غلظت تعادلی اجزای محلول و پراکنده یا امولسیون در فاز آبی (غلظت‌های اسمی= میزان بارگذاری) مخلوط می‌شوند. به‌طور معمول زمان لازم برای مخلوط کردن و ته‌نشینی (برای جداسازی فاز) در پیش آزمون‌ها تعیین می‌شود. به‌طور کلی، بهتر است، هر مادهٔ آزمون نامحلول که رسوب‌کرده یا در ظروف آزمون ته‌نشین‌شده با استفاده از وسیله‌ای مانند، قیف جداکننده از محیط آزمون خارج شود. هنگامی‌که WAF از طریق پالایه‌های مناسب پالایه می‌شود، یک جزء

1- Water-accommodated fractions

محلول در آب (WSF)[1] به‌دست می‌آید (به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۸۸۶۸ [۷] مراجعه شود). نتایج برای مخلوط‌هایی که به‌صورت جزئی حل می‌شوند به‌عنوان نرخ‌های بارگذاری بیان می‌شود. غلظت‌های اثر نیز می‌تواند به‌عنوان غلظت‌های اندازه‌گیری شدهٔ مادهٔ آزمون در WAF نامیده شود.

۱۰-۲-۵ آزمون حد

در برخی شرایط، برای مثال ارزیابی خطرپذیری یا برچسب‌گذاری، اطلاعات در مورد تاثیر غلظت معین کافی است. آزمون حد مقایسهٔ دو نمونه‌ای شامل یک کنترل و یک غلظت آزمون است. آزمون حد در صورتی می‌تواند مناسب باشد که:

- شواهد کافی وجود دارد (به‌عنوان مثال از نتایج یک آزمون سمیت اولیه) که مادهٔ آزمون هیچ‌گونه تاثیرات نامساعد قابل‌توجهی تا غلظت mg/l ۱۰۰یا تا حد حلالیت آن در آب (هر کدام از آن‌ها که پایین‌تر است) ایجاد نمی‌کند. سپس یک آزمون حد در mg/l ۱۰۰ یا در حد حلالیت آب در نظر گرفته می‌شود تا اطلاعات مورد نیاز را برای ارزیابی خطرپذیری یا طبقه‌بندی و برچسب‌گذاری فراهم نماید؛
- یک مطالعهٔ غربال‌گری درنظرگرفته می‌شود تا فقط پاسخ دهد آیا اثری در یک غلظت یا رقت رخ می‌دهد یا نه. برای چنین تحقیقاتی لازم نیست که موجودات زندهٔ آزمون را در معرض دامنهٔ وسیعی از غلظت‌ها یا یک سری رقت کامل قرار دهید؛
- ملاحظات رفاه حیوان مورد آزمون باید در تعادل با اطلاعاتی باشد که از آزمون در دامنهٔ غلظتی کامل مادهٔ آزمون در مقابل محدودهٔ معین غلظت به‌دست آمده است (دومی وابسته به موارد خاصی است که می‌تواند برای نتیجه‌گیری درست کافی باشد).

آزمون‌های تعیین حد برای تشخیص هر اثر خاص که ممکن است با سمیت حاد در غلظت‌های بالاتر ترکیب یا نمونهٔ مورد بررسی پوشیده شود، مناسب نیست. در چنین مواردی، رابطهٔ پاسخ دوز، یکنواخت نیست.

۱۱ تضمین کیفیت آزمون زیستی

۱۱-۱ کلیات

به‌منظور تامین اهداف قانونی، دو سامانهٔ مدیریت کیفیت برای آزمون زیستی استفاده می‌شود. استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۱۷۰۲۵ [13] یک سامانهٔ مدیریت کیفیت توافق شدهٔ آزمایشگاهی برای آنالیز نمونه‌های محیطی (مانند فاضلاب، آب‌های سطحی، رسوبات و خاک‌ها) است. اغلب مسئولین نیاز به آزمایشگاه‌های تایید صلاحیت شده، دارند که در این بخش کار می‌کنند. برای آزمون غیرآزمایشگاهی مواد شیمیایی، آفت‌کش‌ها و محصولات دارویی، مقررات سازمان همکاری و توسعهٔ اقتصادی در مورد روش‌های آزمایشگاهی

1- Water-soluble fraction

مناسب (GLP)[1] [23] در قوانین اروپا با مقررات EC /۱۰/۲۰۰۴ [29]، اجرا شده است. آزمایشگاه‌هایی که تحت GLP کار می‌کنند، باید توسط مراجع ذی‌صلاح[2] گواهی شوند.

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۷۰۲۵ [۱۳] شامل دو بخش اصلی است: الزامات مدیریتی و الزامات فنی. الزامات مدیریتی مربوط به عملکرد و اثربخشی سیستم مدیریت کیفیت است و به تخصیص مسئولیت‌ها، کنترل مدارک و داده‌ها (تصویب، بازبینی) و انجام ممیزی‌های داخلی کیفیت اشاره دارد. الزامات فنی مربوط به صلاحیت کارکنان، روش‌های کالیبراسیون[3] و اعتبارسنجی، دقت تجهیزات و گزارش‌دهی روشن و شفاف و عینی نتایج آزمون است. یکی از اهداف استاندارد ملی ۱۷۰۲۵ [۱۳] بهبود دائمی کیفیت از طریق پایش و کنترل هرگونه عدم انطباق، آنالیز علل و انتخاب و اجرای اقدامات اصلاحی است.

هدف اصول GLP، کسب داده‌های با کیفیت بالا از مطالعات ایمنی محیطی و سلامت غیربالینی و توافق روی پذیرش متقابل این داده‌ها برای ارزیابی محصولات شیمیایی است. اصول GLP مسئولیت‌های مدیریت تاسیسات آزمون، مدیر تحقیق و کارکنان تضمین کیفیت را توصیف می‌کند. هر مطالعه به‌طور دقیق در یک برنامهٔ مطالعاتی طرح‌ریزی می‌شود که توسط مدیر تحقیق، حامی مالی و تضمین کیفیت باید تایید شود. تمام سوابق (برای مثال طرح مطالعه، داده‌های خام، گزارش نهایی، صلاحیت و آموزش) و هم‌چنین نمونه‌ها و مواد باید برای مدت زمانی مشخص در بایگانی ذخیره شوند.

۱۱-۲ تضمین کیفیت در چارچوب بررسی نمونه‌های محیطی

آزمایشگاه‌هایی که آزمون‌های زیستی با نمونه‌های محیطی را برای تامین اهداف قانونی مانند صدور مجوزهای فاضلاب انجام می‌دهند، بهتراست سامانهٔ تضمین کیفیت را بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۷۰۲۵ [۱۳] برقرار کنند. اصول GLP برای نمونه‌های محیطی در نظر گرفته نمی‌شود. درصورت عدم امکان پیاده‌سازی استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۷۰۲۵ [۱۳] (برای مثال سازمان‌های تحقیق و توسعه مانند دانشگاه‌ها)، توصیه می‌شود، برخی از اصول اساسی تضمین کیفیت اجرا شوند. بهتراست حداقل موارد زیر در نظر گرفته‌شود:

- مسئولیت‌های افراد دست‌اندرکار؛
- تشریح اقدامات تضمین کیفیتی که باید انجام شود، برای مثال، در روش‌های عملیاتی استاندارد (SOPs) و در رویه‌های انجام آزمون؛
- اطلاعات در مورد روش آزمون (به‌عنوان مثال دامنه، برنامهٔ زمان‌بندی، پارامترهای آزمون و معیارهای اعتبار)؛
- تایید تجهیزات و ابزار مورد استفاده؛
- نمونه‌برداری و پیش‌آماده‌سازی؛

1- Good Laboratory Practice

۲- سازمان ملی استاندارد- مرکز ملی تایید صلاحیت ایران

3- Calibration

- مواد مرجعی که باید به‌طور مرتب آزمون و نتایج (نمودارهای کنترلی) گزارش شود؛
- اقدامات کنترل کیفیت داخلی؛
- بررسی تجهیزات و وسایل مورد استفاده در فواصل زمانی مانند ترازو و پیپت‌ها؛
- روش‌های بازرسی و بررسی توسط اشخاصی که به‌طور مستقیم در آزمون‌ها دخالت نمی‌کنند.
- مستندسازی، ارزیابی نتایج و ثبت آن‌ها؛
- مدت نگه‌داری سوابق، مدارک حاوی داده‌ها یا اطلاعات مربوط به تحقیق.

کنترل کیفیت خارجی را می‌توان از طریق مشارکت در آزمون‌های بین آزمایشگاهی به‌دست آورد.

۱۲ گزارش

توصیه می‌شود، گزارش آزمون حداقل دارای اطلاعات زیر باشد:

الف- روش آزمون مورد استفاده، همراه با مرجع استاندارد یا روش آزمون مربوطه.

ب- شناسایی نمونهٔ اولیه پیش از تیمار، برای مثال:

- ماهیت نمونه (برای مثال، فاضلاب، پساب، شیرابه، آب سطحی، آب زیرزمینی و رسوب)؛
- شناسایی نمونه (برای مثال خواستگاه، روش نمونه‌برداری، تاریخ و مدت نمونه‌برداری)؛
- ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی و سایر ویژگی‌ها مانند مقدار pH، غلظت اکسیژن برحسب میلی‌گرم بر لیتر (یا درصد اشباع)، هدایت الکتریکی یا شوری، درصورت لزوم ظاهر مانند بو، رنگ و کدورت و برای رسوبات، برای مثال محتوای آب، مقدار مواد آلی و توزیع اندازهٔ ذرات؛
- در صورت لزوم، تمام اطلاعات موردنیاز برای شناسایی کامل مواد شیمیایی مورد آزمون (به‌عنوان مثال شمارهٔ CAS[1]، شمارهٔ بهر، مبدا، خلوص و تاریخ انقضا)؛

پ- توصیف پیش‌آماده‌سازی نمونه، برای مثال:

- ذخیره‌سازی نمونه (شرایط و مدت ذخیره‌سازی) اگر به‌طور مستقیم آزمون نشده باشد؛
- جنس ظرف نمونه؛
- یخ‌زدایی؛
- همگن‌سازی؛

۱- شمارهٔ ثبت CAS (CAS registry number): یا کَس نامبر شمارهٔ شناسایی یکتا برای ترکیبات شیمیایی، پلیمرها، زنجیره‌های زیستی، مخلوط‌ها و آلیاژها است.

- رسوب‌گذاری؛
- سانتریفیوژ (که شامل دور سانتریفیوژ g و زمان آن باشد)؛
- پالایه کردن (از جمله جنس پالایه و اندازهٔ منافذ) و سایر دست‌کاری‌ها؛
- پیش‌تغلیظ؛
- هوادهی؛
- تنظیم شوری؛
- تنظیم pH، نوع عامل خنثی‌کننده؛
- مقدار pH و غلظت اکسیژن برحسب میلی‌گرم در لیتر (یا درصد اشباع) محلول‌های رقیق‌سازی در آغاز آزمون؛
- روش آماده‌سازی محلول‌های مادر و آزمون مواد شیمیایی؛

ت- جزئیات آزمون، برای مثال:

- شروع آزمون و مدت زمان؛
- میزان رقت یا غلظت‌های آزمون شده؛
- دستگاه‌های کشت و روش‌های انکوباسیون (مانند شدت و کیفیت نور)؛
- دما (میانگین و انحراف استاندارد)؛
- pH، غلظت اکسیژن برحسب میلی‌گرم در لیتر (یا درصد اشباع) محلول‌های آزمون شامل کنترل‌ها در شروع و پایان آزمون؛
- ماده (مواد) کنترل و مرجع (نام شیمیایی، منبع، شمارهٔ بهر یا داده‌های قابل مقایسه، در صورت وجود)؛
- شرایط آزمون در شروع آزمون، برای مثال تراکم سلول (بر حسب تعداد سلول در هر میلی‌لیتر)، تراکم باکتری بر حسب واحد رقت فورمازین (FAU)[1] یا طول اولیهٔ بدن موجودات زندهٔ آزمون در معرض؛

ث- نتایج حاصل از آزمون شامل اظهارنظر در مورد اندازه‌گیری عدم قطعیت، در صورت امکان، به‌عنوان مثال:

- نقطهٔ پایانی آزمون (به‌عنوان مثال بازدارندگی رشد)؛
- جزئیات نتایج آزمون (به‌عنوان مثال داده‌های تکرار، تراکم سلول در هر بهر)؛
- میانگین و انحراف معیار پارامترهای آزمون در پیش آماده‌سازی‌ها و کنترل؛

1- Formazine Attenuation Units

- درصد بازدارندگی پارامترهای آزمون در تمام آماده‌سازی‌ها؛
- رابطهٔ بین غلظت و اثر به صورت جدول‌بندی شده یا گرافیکی [به‌عنوان مثال منحنی‌های رشد (لگاریتم متوسط تعداد سلول برحسب زمان) برای هر غلظت و کنترل آزمون]؛
- به‌وسیلهٔ رقیق‌سازی تدریجی، LID؛
- EC_x نشان‌دهندهٔ غلظت مادهٔ آزمون (مواد شیمیایی، مرجع) حل‌شده در محیط آزمون می‌باشد که منجر به x درصد (به‌عنوان مثال ٪ ۱۰ و ٪ ۵۰) کاهش در پارامتر آزمون در مدت زمان مواجههٔ اعلام شده با فاصلهٔ اطمینان می‌شود که شامل روش تعیین نیز است؛
- در صورت امکان، حدود اطمینان ٪ ۹۵ EC_x؛
- روش ارزیابی (برای مثال رگرسیون لوجیت، پروبیت، غیرخطی)؛
- ضریب تغییر؛
- نتایج مقایسهٔ دونمونه‌ای، در صورت انجام؛
- شاخص توان آماری آزمون (به‌عنوان مثال حداقل اختلاف معنی‌دار)؛
- سایر اثرات مشاهده شده مانند از بین رفتن رنگ یاخته‌های جلبکی یا رفتار غیرطبیعی موجودات زندهٔ آزمون؛
- داده‌هایی که اثبات کنند معیارهای اعتبار برآورده شده است؛

ج- هرگونه انحراف از این روش و گزارش شرایطی که می‌تواند بر نتایج تاثیر بگذارد، به‌عنوان مثال:

- هرگونه انحراف از پروتکل آزمون (برای مثال اصلاح ماهیت آب رقیق‌سازی، محلول مواد مغذی، هوادهی، دما، تعداد موجودات زنده، تعداد تکرارها و کنترل‌ها) و گزارش کلیهٔ شرایطی که ممکن است بر نتایج تاثیر بگذارد؛
- هرگونه جزئیات عملیاتی که از طریق استاندارد ملی یا بین‌المللی مورد استفاده مشخص نشده و حوادثی که می‌تواند نتایج را تحت تاثیر قرار دهد.
- تفسیر در مورد نتایج آزمون، در صورت لزوم؛

چ- موجودات زندهٔ آزمون، برای نمونه:

- گونه، نام سیستماتیک؛
- سویه، شمارهٔ سویه؛
- شمارهٔ بهر؛
- خواستگاه؛

- روش کشت؛
- عمر محیط کشت ذخیره؛
- موجود زندهٔ تغذیه‌ای (برای مثال نام سیستماتیک، سویه، خواستگاه)؛

ح- آزمایشگاه، به‌عنوان مثال:

- نام و آدرس آزمایشگاه انجام آزمون؛
- نام فرد (افراد) آزمون‌کننده؛
- امضای مسئول تحقیق؛
- نام و امضای فرد (افراد) تاییدکنندهٔ این گزارش؛
- نام و امضای فرد کنترل‌کنندهٔ کیفیت، در صورت لزوم.

کتاب‌نامه

[۱] استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۳-۱۱۶۱۱: سال ۱۳۹۳، کیفیت آب- نمونه‌برداری- نگه‌داری و انتقال نمونه‌های آب

[۲] استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۱۴-۱۱۶۱۱: سال ۱۳۹۴، کیفیت آب- نمونه‌برداری- تضمین و کنترل کیفیت زیست‌محیطی نمونه‌برداری و جابه‌جایی آب- آئین‌کار

[۳] استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۱۵-۱۱۶۱۱: سال ۱۳۹۱،کیفیت آب- نمونه‌برداری قسمت ۱۵- راهنمای نگه‌داری و جابه‌جایی نمونه‌های لجن و رسوب

[۴] استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۸۹۰۹: سال ۱۳۸۵، کیفیت آب- نمونه‌برداری از رسوبات دریا- آئین کار

[۵] استاندارد ملی ایران- ایزو شمارهٔ ۱۲-۷۲۱۶: سال ۱۳۹۲، ارزیابی بیولوژیکی وسایل پزشکی- قسمت ۱۲- آماده‌سازی نمونه و مواد مرجع

[۶] استاندارد ملی ایران– ایزو شمارهٔ ۱۰۸۴۸: سال ۱۳۸۷، کیفیت آب- اندازه‌گیری عناصر انتخاب شده به‌روش اسپکترومتری نشر نوری با پلاسمای جفت شده القایی

[۷] استاندارد ملی ایران– ایزو شمارهٔ ۸۸۶۸: سال ۱۳۸۵، کیفیت آب- آزمون‌های مهار کنندگی رشد جلبک‌ها با مواد کم محلول، ترکیبات فرار، فلزات و فاضلاب- راهنما

[۸] استاندارد ملی ایران – ایزو شمارهٔ ۱۸۰۷۸: سال ۱۳۹۲، کیفیت آب- تعیین سمیت بحرانی پساب برای تخم‌ها ماهی گورخری

[۹] استاندارد ملی ایران– ایزو شمارهٔ ۱۱۳۲۳: سال ۱۳۸۷، کیفیت خاک- راهنمای آزمون زیست تخریب مواد آلی در خاک تحت شرایط بی هوازی

[۱۰] استاندارد ملی ایران – ایزو شمارهٔ ۱۴۵۳۰: سال ۱۳۹۰، کیفیت خاک- راهنمای ایجاد و نگه‌داری برنامه‌های پایشی

[۱۱] استاندارد ملی ایران– ایزو شمارهٔ ۱۱۷۰۵: سال ۱۳۸۷، کیفیت خاک- تعیین اثرات آلاینده‌ها بر فلور خاک- آزمون غربال‌گری برای جوانه‌زنی دانه رست‌های کاهو (Lactuca sativa L.)

[۱۲] استاندارد ملی ایران– ایزو شمارهٔ ۱۱۷۷۳: سال ۱۳۸۷، کیفیت آب- تعیین اثر سمی ترکیبات آب و فاضلاب بر روی عدسک آبی (lemna minor) آزمون ممانعت از رشد عدسک آبی

[۱۳] استاندارد ملی ایران– ایزو- آی ای سی شمارهٔ ۱۷۰۲۵: سال ۱۳۸۶، الزامات عمومی برای احراز صلاحیت آزمایشگاه‌های آزمون و کالیبراسیون

[14] ISO 5667-1:2006, Water quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques

یادآوری- استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۱۱۶۱۱: سال ۱۳۸۷، کیفیت آب- نمونه‌برداری- راهنمای طراحی برنامه‌های نمونه-برداری، با استفاده از استاندارد ISO 5667-1: 1980 تدوین شده است.

[15] ISO 10253:2016, Water quality — Marine algal growth inhibition test with Skeletonema sp. and Phaeodactylum tricornutum

[16] ISO 10872:2010, Water quality — Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of Caenorhabditis elegans (Nematoda)

[17] ISO 11074:2015, Soil quality — Vocabulary

[18] ISO 13829:2000, Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test

[19] ISO 19458:2006, Water quality — Sampling for microbiological analysis

یادآوری- استاندارد ملی ایران– ایزو شمارهٔ ۴۲۰۸: سال ۱۳۸۶، کیفیت آب- نمونه‌برداری از آب برای آزمون‌های میکروبیولوژی- آئین‌کار، با استفاده از استاندارد ISO 19458:2006 و سایر منابع تدوین شده است.

[20] ISO/TS 20281:2006, Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data

[21] ISO/TR 15462:2006, Water quality — Selection of tests for biodegradability

[22] OECD. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Series on Testing and Assessment, No. **23**. OECD Publishing, 2002

[23] OECD. OECD Principles on Good Laboratory Practice, OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring, No. **1**. OECD Publishing, 2003

[24] Sokal R.R., & Rohlf F.J. (1995) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3rd Edition. W. H. Freeman and Company, New York

[25] van der Hoeven N. Calculation of the minimum significant difference at the NOEC using a non-parametric test. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2008, **70** pp. 61–66

[26] Macova M., Escher B.I., Reungoat J., Carswell S., Chue K.L., Keller J. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. Water Res. 2010, **44** pp. 477–492

[27] Escher B.I., Bramaz N., Maurer M., Richter M., Sutter D., von Känel C. Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater. Environ. Toxicol. Chem. 2005, **24** pp. 750–758

[28] Escher B.I., Bramaz N., Quayle P., Rutishauser S., Vermeirssen E.L.M. Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. J. Environ. Monit. 2008, **10** pp. 622–631

[29] Directive 2004/10/EC of 11 February 2004 on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances

Further reading

[30] Further bibliographic information on sampling (general methods, sampling pre-treatment, performance and evaluation of biotests) can be obtained from the Secretariat of ISO/TC 147/SC 6, Sampling – General methods

[31] Further bibliographic information on biotesting can be obtained from the Secretariat of ISO/TC 147/SC 5, Biological methods

[32] OECD Test Guidelines for non-clinical environment and health safety testing of chemicals and chemical products. [viewed 2017-03-03]. Available at: http://www.oecd.org/env/ehs/